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

**Filogeografia de *Cattleya loddigesii* Lindl. e *Cattleya harrisoniana*
(ex Lindl.) Bateman (Orchidaceae)**

Thaís Melega Tomé

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

**Piracicaba
2016**

Thaís Melega Tomé
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

**Filogeografia de *Cattleya loddigesii* Lindl. e *Cattleya harrisoniana* (ex
Lind.) Bateman (Orchidaceae)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof. Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

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

Piracicaba
2016

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

Tomé, Thaís Melega

Filogeografia de *Cattleya loddigesii* Lindl. e *Cattleya harrisoniana* (ex Lindl.) Bateman (Orchidaceae) / Thaís Melega Tomé. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

121 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Filogeografia 2. Delimitação de espécies 3. Introgressão 4. *Cattleya loddigesii*
5. *Cattleya harrisoniana* 6. cpDNA 7. ITS I. Título

CDD 635.93415
T656f

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à ESALQ/USP e ao Depto. de Genética pelo total apoio e confiança nesses últimos anos e pela experiência obtida. Sou grata também ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida a mim durante os dois anos do mestrado e ao financiamento desse estudo por intermédio do projeto universal “Sistemática, Filogenia e Variabilidade de Laeliinae (Orchidaceae): estudos integrados III”. Agradeço também à Prof. Dra. Elizabeth Ann Veasey pela orientação, parceria, compreensão e confiança por esses anos. Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Cássio van den Berg pelo total apoio e auxílio nas diferentes etapas desse trabalho, onde foram cruciais para a realização e conclusão.

Agradeço de coração as pessoas que tive a oportunidade de conviver no LAMOL/UEFS-BA, Evandro, Daniele, Leilane, Evelyne, Gabriela, Wallace, Lamarck, Daiane, Maria Cristina, Lucas, Marcos e outros. Também agradeço profundamente à Dona Rita e ao Cassiano, que me aguentaram por alguns meses. São pessoas maravilhosas que merecem total apoio e gratidão.

Aos grandes amigos, colegas e companheiras de laboratório que convivi durante esse tempo, Gabriel, Santiago, Sueme, Alessandro, Maísa, Melina, Adriana, Flaviane, Cattleya (Vitória), Vinícius, Mariana, Vanessa, Tatiane, Nancy, Jucelene, Juliana e as inúmeras amigas de outros laboratórios que tive o prazer de conviver. Também aos funcionários que me auxiliaram de diversas formas durante esse período que foram muito cordiais: Marcão, Josué e Décio.

Agradeço especialmente ao meu pai, minha mãe e minha irmã pelo apoio, carinho e compreensão nessa etapa da minha vida, sem vocês nada disso teria acontecido. Agradeço também aos meus sogros, Nádia e Luiz Augusto, também minha cunhada Ana Luiza pelo apoio e carinho mais que especiais. Um carinho especial e a enorme satisfação de ter Luiz Felipe e Gabriela na minha vida. Vocês me transformam em uma pessoa melhor a cada dia. Por isso, sou grata por todo apoio, auxílio e compreensão nesses anos e saibam que amo vocês!

A todos, muito obrigada!

EPÍGRAFE

"E, se bem que seja obscuro
Tudo pela estrada fora,
E falso, ele vem seguro,
E, vencendo estrada e muro,
Chega onde em sono ela mora.
E, inda tonto do que houvera,
A cabeça, em maresia,
Ergue a mão, e encontra hera,
E vê que ele mesmo era A Princesa que dormia."

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO GERAL	23
2.1 Objetivos específicos	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Família Orchidaceae	25
3.1.1 <i>Cattleya loddigesii</i> e <i>Cattleya harrisoniana</i>	29
3.1.1.1 Hibridação e introgressão.....	32
3.2 Filogeografia.....	34
3.3 Marcadores moleculares	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Coleta e extração de DNA.....	43
4.2 Marcadores moleculares	43
4.3 Amplificação das regiões testadas	44
4.4 Edição de sequências e alinhamento.....	45
4.5 Análises de dados	46
5 RESULTADOS	53
5.1 Seleção dos marcadores.....	53
5.2 Análise da diversidade genética.....	54
5.3 Análises de estruturação genética das populações	56
5.4 Distribuição dos haplótipos nas populações.....	62
5.5 Proporção do fluxo gênico via pólen X sementes.....	66
5.6 Estimativa do tempo de divergência.....	67
5.7 Demografia histórica	70
5.8 Reconstrução filogeográfica	77
6 DISCUSSÃO	81
6.1 Diversidade genética	81
6.2 Divergência entre linhagens de <i>C. loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i>	81
6.3 Hibridação e introgressão.....	84
6.4 Estruturação das populações	86
6.5 Reconstrução filogeográfica	90
7 CONCLUSÕES	95

REFERÊNCIAS	97
APÊNDICES	113
ANEXOS.....	119

RESUMO

Filogeografia de *Cattleya loddigesii* Lindl. e *Cattleya harrisoniana* (ex Lindl.) Bateman

O Brasil abrange grande diversidade de espécies da família Orchidaceae, onde o gênero *Cattleya* se destaca devido a reconhecida importância horticultural e espécies altamente relacionadas de difícil delimitação taxonômica. Anteriormente, *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana* foram reconhecidas como espécies distintas devido à descontinuidade morfológica, fenológica e distribuição geográfica. Entretanto, esses critérios não são suficientes para determinar com clareza a delimitação dessas espécies, uma vez que existem populações com características morfológicas e fenológicas intermediárias consideradas introgridas. Com o intuito de esclarecer o relacionamento entre *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*, a relação das populações introgridas, a estruturação das populações, bem como padrões filogeográficos envolvidos, análises filogeográficas baseadas em sequências de DNA de cloroplasto (cpDNA) e DNA nuclear ribossomal (ITS) foram utilizadas. No total, foram amostrados 130 indivíduos das duas espécies distribuídos em 17 populações. Os resultados obtidos suportam a distinção entre as plantas, onde a árvore de estimativa de tempo de divergência para ITS separou mais evidentemente em clados distintos as duas espécies, corroborando a alta estruturação encontrada pela AMOVA ($\Phi_{CT} = 0,597$), distribuição haplotípica e análises bayesianas. Apesar disso, os resultados para cpDNA não evidenciaram claramente essa distinção. Os resultados obtidos pelo software Migrate também suportam a distinção das espécies e, ainda, sugerem que as populações introgridas são mais relacionadas com *C. loddigesii*. Ademais, os dados sugerem que a estruturação populacional encontrada segue o modelo de isolamento por distância, assim como sugeriram as análises de clados aninhados – NCPA e bayesiana. Ademais, os resultados de estruturação para ambas as regiões, e as possíveis incongruências entre os resultados de cpDNA e ITS estão indicando que existe maior número de indivíduos híbridos e introgressão, necessitando de novos estudos para corroborar essas evidências. Uma das possíveis razões pelo amplo compartilhamento de haplótipos, principalmente para cpDNA, pode ter sido devido à conectividade mantida através das populações introgridas. Além disso, a reprodução alogâmica, a dispersão por abelhas e a dispersão de sementes pelo vento a longas distâncias podem também ter contribuído para a conexão entre elas. Os resultados da reconstrução filogeográfica, bem como o número de migrantes sugerem que as populações se dispersaram em direção ao Norte-Sul em períodos glaciais do Pleistoceno. Além disso, a alta diversidade e a diferenciação das populações do extremo Sul de SP indicam indícios de uma possível zona de refúgio neste local.

Palavras-chave: Filogeografia; Delimitação de espécies; Introgressão; *Cattleya loddigesii*; *Cattleya harrisoniana*; cpDNA; ITS

ABSTRACT

Phylogeography of the *Cattleya loddigesii* Lindl. and *Cattleya harrisoniana* (ex Lindl.) Bateman

Brazil covers a wide range of species of the orchid family, where the *Cattleya* genus stands out due to a recognized horticultural importance and highly related species difficult taxonomic delimitation. Previously, *Cattleya loddigesii* and *C. harrisoniana* were recognized as distinct species due to morphological, phenological and geographical distribution discontinuity. However, these criteria are not sufficient to determine clearly the identification of these species, as there are populations with intermediate morphological and phenological characteristics considered introgressed. In order to clarify the relationship between *C. loddigesii* and *C. harrisoniana*, the ratio of introgressed populations, the population structure and the phylogeographic patterns involved, phylogeographic analyses based on chloroplast DNA sequences (cpDNA) and ribosomal nuclear DNA (ITS), were used. Overall, we sampled 130 individuals of the two species distributed into 17 populations. Results support the distinction between plants, where the tree of divergence time estimate for ITS separated the two species more clearly into distinct clades, corroborating the high structure found by AMOVA ($\Phi_{CT} = 0.597$), haplotype distribution and Bayesian analyses. Nevertheless, the results for cpDNA did not demonstrate that distinction clearly. The results obtained by the Migrate software also support the species distinction and suggest that the introgressed populations are more closely related to *C. loddigesii*. Furthermore, the data suggest that the population structure found follows the isolation by distance model, as also suggested in the nested clades - NCPA and Bayesian analyses. Furthermore, the population structure results for both regions, plus possible inconsistencies between the cpDNA and ITS results, may indicate that there is a greater number of hybrid individuals and introgression, requiring new studies to corroborate this evidence. One of the possible reasons for the broad sharing of haplotypes, especially for cpDNA, may have been due to connectivity maintained through introgressed populations. Furthermore, the allogamous reproduction, the dispersal by bees and dispersal of seeds by wind over long distances may also have contributed to the connection between them. The results of phylogeographic reconstruction, as well as the number of migrants suggest that the population is dispersed towards North-South in glacial periods of the Pleistocene. In addition, the high diversity and differentiation of populations of the Southern tip of SP indicate evidence of a possible refuge zone at this area.

Keywords: Phylogeography; Species delimitation; Introgression; *Cattleya loddigesii*; *Cattleya harrisoniana*; cpDNA; ITS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Árvore de datação molecular indicando a estimativa do tempo de divergência e relação entre os gêneros da subtribo Laeliinae (SANTOS; VAN DEN BERG, dados não publicados). O eixo X indica a escala de tempo em milhões de anos (Ma) atrás e a barra azul indica o intervalo de confiança a 95%27
- Figura 2 - Flor da espécie *Cattleya loddigesii* Lindl. (esquerda) pertencente à população de Alfenas, MG e *C. harrisoniana* Bateman ex Lindl. (direita) exemplar da população de Cordovil, RJ.....29
- Figura 3 - Fenologia das populações estudadas por van den Berg (1996). Gráfico superior esquerdo representa populações de *Cattleya loddigesii* do interior do Estado de São Paulo. Gráfico superior direito, populações de *C. loddigesii* do sul do Estado de Minas Gerais. Gráfico inferior, populações da espécie *C. harrisoniana*31
- Figura 4 - Padrão de estruturação do estudo com marcadores ISSR (Santos et al., 2009) indicando diferenciação entre espécies, onde as plantas híbridas são mais próximas de *C. harrisoniana*. O agrupamento predominantemente da cor verde indica as populações da espécie *C. loddigesii* e o agrupamento da cor vermelho indica as populações de *C. harrisoniana* (Cordovil-RJ e Muqui-ES) e as populações introgridas de São José dos Campos-SP e Careacú-MG33
- Figura 5 - Mapa da distribuição das populações de *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana* utilizadas nesse estudo43
- Figura 6 - (A) Eletroferograma parcial de um indivíduo de Porangaba-SP, ilustrando um exemplo de boa qualidade do sequenciamento para o marcador ITS. (B) Eletroferograma que corresponde à sequência parcial de um indivíduo da população de Brotas-SP, ilustrando a presença de picos duplos no sequenciamento.....54
- Figura 7 - Gráficos gerados a partir do Structure Harvester online (Link: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) onde se avaliou o número ótimo de populações (K) de Evanno, a partir de (A) regiões plastídias, (B) nucleares e (C) combinadas para *Cattleya harrisoniana* e *C. loddigesii*60
- Figura 8 - Gráfico da estruturação das populações de *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana* com marcadores cpDNA (A), ITS (B) e combinados (C), gerados a

partir da análise bayesiana e selecionados a partir do valor ótimo de K de Evanno (2005) 61

Figura 9 - Distribuição dos haplótipos construída a partir das regiões de cpDNA e dados geográficos das populações em estudo. Populações de *Cattleya harrisoniana*: H1-Muqui-ES; H2-Cordovil-RJ; Hib3-Careaçú-MG; Hib4-São José dos Campos-SP. Populações de *C. loddigesii*: Minas Gerais: L1-Tiradentes; L2-Carrancas; L3-Alfenas; L4-Ouro Fino; L5-Extrema e L14-Rio Preto. São Paulo: L6-Agudos; L7-Brotas; L8-Santa Maria da Serra; L9-Iracemápolis; L10-Piracicaba; L11-Conchas; L12-Porangaba; L13-Alambari. Os diferentes haplótipos estão representados por cores distintas..... 63

Figura 10 - Distribuição dos haplótipos construído a partir da região de ITS e dados geográficos de populações em estudo. Populações de *Cattleya harrisoniana*: H1-Muqui-ES; H2-Cordovil-RJ; Hib3-Careaçú-MG; Hib4-São José dos Campos-SP. Populações de *C. loddigesii*: Minas Gerais: L1-Tiradentes; L2-Carrancas; L3-Alfenas; L4-Ouro Fino; L5-Extrema. São Paulo: L6-Agudos; L8-Santa Maria da Serra; L9-Iracemápolis; L10-Piracicaba; L11-Conchas; L12-Porangaba; L13-Alambari. Os diferentes haplótipos estão representados por cores distintas 63

Figura 11 - Representação da análise de clados aninhados (NCPA) para os marcadores cpDNA. Os haplótipos de maior tamanho correspondem ao maior número de indivíduos. De dentro para fora, cada haplótipo é circulado de maneira que os mais próximos ficam unidos (contorno preto contínuo), enquanto que os clados maiores (tracejados) correspondem ao conjunto de clados menores mais próximos..... 65

Figura 12 - Representação da análise de clados aninhados (NCPA) para os marcadores ITS. Os haplótipos de maior tamanho correspondem ao maior número de indivíduos. De dentro para fora, cada haplótipo é circulado de maneira que os mais próximos ficam unidos (contorno preto contínuo), enquanto que os clados maiores (tracejados) correspondem ao conjunto de clados menores mais próximos..... 66

Figura 13 - Datação molecular dos 15 haplótipos das espécies *Cattleya harrisoniana* e *C. loddigesii* obtidos com marcadores cpDNA mais o grupo externo. A barra inferior indica o tempo em milhões de anos atrás. A barra azul observada em cada nó corresponde ao intervalo de confiança de 95% 68

- Figura 14 - Datação molecular dos 24 haplótipos das espécies *Cattleya harrisoniana* e *C. loddigesii* obtidos a partir de regiões ITS mais o grupo externo. A barra inferior indica o tempo em milhões de anos atrás. A barra azul observada em cada nó corresponde ao intervalo de confiança de 95%.....69
- Figura 15 - Número de indivíduos migrantes (Nm) para marcadores cpDNA e ITS. O eixo X indica o fluxo da migração, onde a seta aponta para a população que recebeu migrantes. O eixo Y indica o número de indivíduos migrantes em uma geração de 10 anos76
- Figura 16 - Gráficos Skyline de marcadores cpDNA e ITS combinados. O eixo X corresponde ao tempo de coalescência e o eixo Y expressa o tamanho populacional. A linha pontilhada indica a condição do tamanho populacional com relação ao tempo decorrido. A área em cinza corresponde ao intervalo de confiança de 95%. Os gráficos A e C correspondem às populações da espécie *Cattleya loddigesii* sem as populações híbridas de Careacú-MG e S. J. dos Campos-SP e considerando-as, respectivamente. Os gráficos B e D são da espécie *C. harrisoniana* sem as populações híbridas e com as populações híbridas, respectivamente77
- Figura 17 - Mapa de reconstrução filogeográfica obtidos através de dados cpDNA e ITS combinados para as espécies *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana*, simulando a ocorrência de dispersões entre 750 mil anos até o presente.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das populações amostradas, origem e fonte de obtenção das amostras, número de indivíduos e coordenadas geográficas das populações de <i>Cattleya loddigesii</i> , <i>Cattleya harrisoniana</i> e duas populações introgridas.....	42
Tabela 2 - Análise de diversidade genética para os marcadores cpDNA e ITS utilizados para as espécies <i>Cattleya loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i>	54
Tabela 3 - Análise de diversidade genética para <i>Cattleya harrisoniana</i> (H1 e H2), populações introgridas (Hib3 e Hib4) e <i>C. loddigesii</i> (L1 a L13) para os marcadores cpDNA e ITS com a composição dos haplótipos nas populações, o número de indivíduos analisados (N), e os índices de diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).	55
Tabela 4 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para regiões cpDNA considerando todas as populações sem discriminar espécies.....	56
Tabela 5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para a região ITS considerando todas as populações sem discriminar espécies.	56
Tabela 6 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) realizada para marcadores cpDNA considerando as populações introgridas como sendo <i>Cattleya harrisoniana</i> mais as populações de <i>C. loddigesii</i>	57
Tabela 7 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) realizada para marcadores ITS considerando as populações introgridas como sendo <i>Cattleya harrisoniana</i> mais as populações de <i>C. loddigesii</i>	57
Tabela 8 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) realizada para marcadores cpDNA considerando as populações introgridas como <i>Cattleya loddigesii</i> mais as populações de <i>C. harrisoniana</i>	57
Tabela 9 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) realizada para marcadores ITS considerando as populações introgridas como <i>Cattleya loddigesii</i> mais as populações de <i>C. harrisoniana</i>	58
Tabela 10 - Análises da Variância Molecular (AMOVA) realizadas para cada espécie separadamente a partir de marcadores cpDNA e ITS.	59
Tabela 11 - Comparação dos modelos usando Bayes Factor (BF) e probabilidade marginal para inferir na quantidade provável de espécies para os três modelos testados: Panmítico, Estruturação das populações e Estruturação das populações considerando isolamento por distância (IBD).	71

Tabela 12 - Comparação dos modelos usando Bayes Factor (BF) e probabilidade marginal para inferir o grau de parentesco das populações introgridas (Hib3 e Hib4) para os modelos: Panmítico, Estruturação das populações e Estruturação das populações considerando isolamento por distância (IBD).	72
Tabela 13 - Comparação dos modelos usando Bayes Factor (BF) e probabilidade marginal para inferir se as populações apresentam padrões panmíticos ou se encontram estruturadas: Panmítico X Estruturação.	73
Tabela 14 - Comparação dos modelos usando Bayes Factor (BF) e probabilidade marginal para inferir se a estruturação das populações segue o modelo de isolamento por distância (IBD).....	74
Tabela 15 - Tamanho efetivo populacional (N_e) em populações de <i>Cattleya loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i> para regiões cpDNA concatenadas e ITS.	75

1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae compõe grande parte da diversidade das plantas superiores existentes, sendo considerada a maior família de angiospermas monocotiledôneas conhecidas atualmente. Estima-se que a família possua cerca de 26 mil espécies (WORLD CHECKLIST OF SELECTED PLANT FAMILIES, 2011) e 736 gêneros (CHASE et al., 2015) distribuídas em todo o globo, com exceção apenas dos polos e regiões desérticas. Geralmente apresentam hábitos epifíticos, mas também podem ser encontradas em hábitos rupícolas, saprófitas e terrícolas (DRESSLER, 1993). No Brasil são conhecidas mais de 2.400 espécies, em que só na Mata Atlântica Brasileira são encontradas mais de 1.400, sendo considerado o bioma com maior riqueza de espécies (FORZZA et al., 2010). Dentro de tamanha biodiversidade, a subtribo Laeliinae (subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae) é conhecida por conter espécies de grande importância horticultural (DRESSLER, 1993; PRIDGEON, 2005).

O gênero neotropical *Cattleya* Lindl. é um dos grandes destaques da subtribo onde a diversidade e beleza das flores são importantes atrativos ornamentais. Muitas delas compartilham semelhanças morfológicas que vem desafiando pesquisadores há anos. Dentro do subgênero *Intermediae*, a linhagem que inclui *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*, é um caso de aspectos taxonômicos problemáticos devido à grande semelhança morfológica entre elas. Na literatura, alguns pesquisadores as classificaram como sendo a mesma espécie, onde *C. harrisoniana* era, muitas vezes, apontada como uma variação de *C. loddigesii* (HAWKES, 1965; BRIEGER et al., 1981). Por outro lado, van den Berg (1996), em consonância com outros autores (PABST; DUNGS, 1975; BRAEM, 1984; WITHNER, 1988, apontou que as plantas de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* possuem diferenças morfométricas e descontinuidade fenológica marcante, sugerindo serem compostas de linhagens distintas. Apesar da morfologia das plantas ter sido investigada detalhadamente, abordagens genéticas também são necessárias para poder inferir com maior precisão a classificação taxonômica de ambas, já que através do DNA, é possível identificar registros genéticos que podem informar sobre a história evolutiva das plantas.

Segundo van den Berg e Martins (1998), a floração característica de *C. loddigesii* é no inverno (maio a agosto), e no verão em *C. harrisoniana* (dezembro a fevereiro), embora haja registros de floração de *C. loddigesii* no verão juntamente com o período em que *C. harrisoniana* costuma florescer (HOEHNE, 1949; PANSARIN; PANSARIN, 2010). A distribuição geográfica também é parcialmente descontínua, onde *C. loddigesii* é encontrada na Mata Atlântica em Minas Gerais e no interior dos Estados do Paraná, São Paulo e nordeste da Argentina (BARBOSA RODRIGUES, 1996), enquanto que *C. harrisoniana* é considerada endêmica da Mata Atlântica Brasileira. *C. harrisoniana* é encontrada, predominantemente, em regiões costeiras do Sudeste brasileiro nos Estados de Espírito Santo, Rio de Janeiro e interior de São Paulo (WITHNER, 1988; PANSARIN; PANSARIN, 2010), onde ocorre em simpatria com populações de *C. loddigesii* (FERREIRA et al., 2010; VAN DEN BERG¹, informação verbal).

Devido à ocorrência de sobreposição entre as populações das duas plantas, o cruzamento entre elas se torna favorável, podendo, em caso de serem espécies distintas, levar à ocorrência de hibridação e introgressão. Van den Berg (1996) identificou populações possivelmente introgridas de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* nos municípios de São José dos Campos-SP e Careacú-MG, que apresentaram características morfométricas intermediárias (VAN DEN BERG, 1996), mas com grau de diferenciação das demais. Nesse aspecto, o autor não descartou a possibilidade dessas populações serem, na verdade, subespécies. Portanto, uma nova investigação com dados de sequência de DNA, torna-se relevante para inferir na delimitação dessas espécies, uma vez que esses dados podem complementar os estudos anteriores de morfologia, fenologia, distribuição geográfica (VAN DEN BERG; MARTINS, 1998) e estudo genético com marcadores ISSR (SANTOS et al., 2009; TOMÉ et al., dados não publicados).

Estudos evolutivos e demográficos de populações de uma mesma espécie e espécies distintas são importantes para inferir os possíveis eventos que levaram-nas a serem como são conhecidas atualmente. Uma das áreas responsáveis por esses estudos é a Filogeografia, onde é possível inferir a ocorrência de eventos evolutivos, tais como seleção, deriva genética, fluxo gênico, dispersão e migração, que foram

¹ van den Berg, C. Universidade Estadual de Feia de Santana.

responsáveis pela distribuição genética e ecológica das espécies atuais. (TEMPLETON et al., 1995; NEWTON et al., 1999; AVISE, 2000).

As diversas oscilações climáticas e geológicas do Mioceno e Pleistoceno podem ter sido grandes responsáveis pela distribuição das espécies animais e vegetais atuais (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Por consequência dessas oscilações as florestas sofreram expansão e contração e, muitas espécies, na luta pela sobrevivência, migraram para zonas de conforto, conhecidas atualmente como refúgios (PROVAN; BENNET, 2008). A ideia principal da teoria se baseia na modificação da distribuição espacial e na abundância de espécies em determinados locais, como consequência das mudanças climáticas provenientes do passado (PROVAN; BENNET, 2008). Segundo van den Berg (1996) as orquídeas se encaixam bem com essa teoria, e infere sobre uma possível zona de refúgio no Sul do Estado de São Paulo, necessitando, assim, de mais estudos que possam complementar essa hipótese.

Como consequência de algumas questões levantadas em estudos anteriores (VAN DEN BERG, 1996; VAN DEN BERG; MARTINS, 1998), esse estudo visa testar hipóteses que buscam esclarecer e complementar a delimitação de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*. Além disso, como as populações possuem zonas de ocorrência simpátricas, torna-se possível a ocorrência de eventos de hibridação, como encontrado por van den Berg (1996). Nessas populações, onde o autor identificou populações introgridas, foi observado a ocorrência de populações isoladas, onde não há identificação de cruzamentos entre elas. Portanto, é necessário também testar se essas populações formam linhagens distintas ou se são mais próximas de *C. loddigesii* ou *C. harrisoniana*. Ademais, é importante investigar as diferentes rotas de dispersão das populações com o intuito de esclarecer os possíveis eventos filogeográficos que podem ter contribuído para a divergência ou não das espécies bem como a distribuição e possível estruturação das populações devido ao isolamento em algumas áreas biogeográficas.

2 OBJETIVO GERAL

Por muitos anos, as espécies *Cattleya loddigesii* Lindl. e *Cattleya harrisoniana* Bateman foram alvo de incertezas evolutivas que até hoje não estão totalmente esclarecidas. Portanto, esse estudo tem como objetivo inferir relações filogeográficas e de genética de populações com o intuito de contribuir para a compreensão dos processos evolutivos envolvidos em ambas as plantas, tais como delimitação de espécies, demografia histórica e processos biogeográficos que podem ter sido responsáveis por moldar a distribuição espacial das populações.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar a diversidade e estrutura genética de populações de *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana* utilizando marcadores cpDNA e ITS.
- Inferir a possível delimitação de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*, bem como das populações introgridas sugeridas por van den Berg (1996).
- Assumindo-se que *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* são compostas por linhagens distintas, inferir o grau de parentesco das populações introgridas identificadas por van den Berg (1996) com as espécies.
- Inferir se há existência de populações panmíticas ou se as populações estão estruturadas, e, em caso de estruturação, verificar se há relação com isolamento por distância.
- Investigar a eficiência de dispersão via pólen x sementes, para inferir os padrões de dispersão entre as populações.
- Inferir possíveis padrões de biogeografia histórica com o intuito de esclarecer fatores evolutivos que moldaram a atual distribuição de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Orchidaceae

A família Orchidaceae – Ordem Asparagales – compreende cerca de 10% da gama de diversidade que compõe o grupo das angiospermas, com cerca de 850 gêneros e mais de 26 mil espécies (WCSP, 2011), embora Chase et al (2015) consideraram 736 gêneros devido à incertezas na classificação de alguns deles. Os membros desta família são encontrados em quase todos os biomas, com exceção apenas dos polos e regiões desérticas, podendo apresentar hábitos rupícolas, saprófitas, terrícolas e, na maioria delas, epífitas (DRESSLER, 1993). Uma das razões pela ampla distribuição dessa família é o sucesso adaptativo, uma vez que as espécies possuem diferentes estratégias de sobrevivência, como por exemplo, a síndrome da polinização e grande diversidade morfológica (HOEHNE, 1949). Embora sua abrangência seja cosmopolita, a família apresenta maior número de espécies em regiões tropicais úmidas, especificamente na Ásia e nas Américas (DRESSLER, 1993). No Brasil, são encontradas mais de 2400 espécies distribuídas em aproximadamente 240 gêneros, sendo um dos países com maior riqueza de orquídeas. Além disso, a família compõe o maior grupo das espécies endêmicas do Brasil (FORZZA et al., 2012).

A subtribo Laeliinae (subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae), descrita em 1881 por Bentham, engloba grande parte da biodiversidade de orquídeas encontradas nas Américas, constituídas por mais de 2.000 espécies distribuídas em 40 gêneros (VAN DEN BERG; SOTO-ARENAS, 2005). Dentro dessa enorme diversidade, o gênero neotropical *Cattleya* Lindl., destaca-se como sendo um dos grandes portadores de espécies com grande atrativo ornamental.

Nos últimos anos, estudos evolutivos com enfoque filogenético tiveram um papel importante na classificação das espécies do gênero incorporando novas alianças taxonômicas. Em um estudo filogenético elaborado com o emprego de sequências de DNA em regiões nucleares, van den Berg e Chase (2000) observaram que as espécies brasileiras de *Laelia* Lindl. eram geneticamente distantes das *Laelia* mexicanas. Com isso, van den Berg e Chase (2000, 2001) transferiram as espécies de *Laelia* brasileiras para o gênero *Sophranitis* Lindl., e este último para *Cattleya* (VAN DEN BERG, 2008). Então, van den Berg (2008) sugeriu

uma nova classificação das espécies em *Cattleya* integrando assim, novas alianças. Mais tarde, um estudo complementar realizado por van den Berg et al. (2009) chegou a um consenso entre dados contrastantes de árvores de regiões distintas de DNA e complementou os estudos anteriores corroborando a posição filogenética das alianças com *Cattleya*. Como consequência, a inserção de novas espécies em *Cattleya* classificou o gênero como parafilético e consequentemente, houve grande aumento no número de espécies de 50 (WITHNER, 1988) para cerca de 114 (VAN DEN BERG, 2014).

Em um estudo filogenético abordando a nova classificação de *Cattleya*, a partir da árvore de estimativa de tempo de divergência de Santos e van den Berg (dados não publicados), indicou que *Cattleya* sp. parece ter divergido dos gêneros *Brassavola*, *Guarianthe* e *Rhincolaelia* há cerca de 10-12 milhões de anos (Figura 1). O período em que foi estimada a divergência é marcado pelo Mioceno, onde importantes eventos evolutivos podem ter ocorrido devido a oscilações climáticas, incluindo as mudanças na distribuição geográfica e, consequentemente, eventos de reticulação e hibridação, como observados por Santos (2011), van den Berg (2014) e Rodrigues (2015).

Figura 1 - Árvore de datação molecular indicando a estimativa do tempo de divergência e relação entre os gêneros da subtribo Laeliinae (SANTOS; VAN DEN BERG, dados não publicados). O eixo X indica a escala de tempo em milhões de anos (Ma) atrás e a barra azul indica o intervalo de confiança a 95%

As espécies do gênero *Cattleya* estão, atualmente, distribuídas na América do Sul e Central (WITHNER, 1988, 1993; DRESSLER, 1993; VAN DEN BERG, 2005, 2008) e são encontradas em habitats rupícolas, terrestres e epífitas, desde regiões ao nível do mar até florestas de grande altitude (WITHNER, 1988, 1993; BARBOSA RODRIGUES, 1996; PRIDGEON, 2005). Possuem grandes variações nos

pseudobulbos, podendo ser longos e cilíndricos (subgênero *Intermediae*, por exemplo) (LINDLEY, 1824; WITHNER, 1988) até menores, arredondados ou achatados (como em algumas *Sophranitis*) (WITHNER, 1993). As folhas são, geralmente, oblongas, elípticas, em algumas plantas elípticas lanceoladas e, podem ter uma (unifoliada), duas (bifoliada) ou, raramente, três folhas (trifoliadas) por pseudobulbo (BRAEM, 1984). As inflorescências são geralmente terminais e apresentam poucas flores por pedúnculo, embora existam algumas espécies que possuem maior número de flores (*Cattleya leopoldii* Verschaffelt ex Lemaire, *Cattleya guttata* Lindley, *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f. ex Warner, entre outras) (WITHNER, 1988). Muitas das espécies do gênero exibem flores de tamanhos grandes e cores exuberantes, tornando-as conhecidas, economicamente, pelo seu alto valor ornamental (WITHNER, 1988; VAN DEN BERG, 2005, 2008).

A importância horticultural em *Cattleya* bem como sua grande biodiversidade reconhecida reflete a necessidade de se estudar o gênero para adquirir informações importantes sobre a composição, classificação e estratégias de sobrevivência das plantas. Nesse contexto, entender os padrões evolutivos que foram responsáveis pela distribuição, origem e mecanismos ecológicos envolvidos são imprescindíveis para a manutenção e conservação das espécies (FRANKHAM et al., 2008). Embora nos últimos anos houve considerável contribuição no entendimento de incertezas em estudos com espécies de orquídeas, muitas questões ainda incertas necessitam de esclarecimentos (HOEHNE, 1949; WITHNER, 1988, VAN DEN BERG, 1996, 1998).

Espécies altamente relacionadas ainda são consideradas um desafio recorrente em pesquisas envolvendo delimitação de espécies em *Cattleya*. Essas espécies apresentam grandes obstáculos para resolver incertezas taxonômicas, uma vez que necessitam integrar estudos com diferentes abordagens para adquirir respostas sólidas. Os pares de espécies problemáticos estudados por Van den Berg e Martins (1998), *C. guttata* e *C. leopoldii* (sinônimo de *C. tigrina*), *C. schofieldiana* e *C. granulosa*, *C. warnerii* e *C. labiata*, *C. nobilior* e *C. walkeriana* e *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* são exemplos de delimitações ainda passíveis de maiores esclarecimentos. Apesar do estudo de van den Berg e Martins (1998) ter focado alguns dos possíveis mecanismos de isolamento dos pares de espécies, tais como, distribuição geográfica, descontinuidade fenológica e morfológica, ainda há a necessidade de estudos com novas abordagens para tentar esclarecer os padrões de delimitação dessas espécies.

3.1.1 *Cattleya loddigesii* e *Cattleya harrisoniana*

As semelhanças morfológicas entre *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* levaram alguns pesquisadores a sugerir que fossem a mesma espécie e, ainda, que *C. harrisoniana* pudesse ser uma variação de *C. loddigesii* ou até mesmo uma subespécie (HAWKES, 1965; BRIEGER et al., 1981). Entretanto, van den Berg (1996) investigando a morfometria das duas espécies observou algumas diferenças nas flores e, principalmente na época de floração das plantas, sugerindo que são espécies distintas, assim como outros autores (PABST; DUNGS, 1975; BRAEM, 1984; WITHNER, 1988). Apesar disso, ainda faltam estudos para comprovar se realmente as plantas pertencem a linhagens distintas ou não. As principais características em comum entre as plantas *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* são pseudobulbos cilíndricos e alongados com duas folhas no topo (bifoliadas) elíptico-lanceoladas e coriáceas, pedúnculos com até oito flores de coloração lilás, podendo variar do claro até o escuro e gemas florais envoltos por uma proteção denominada espata (LINDLEY, 1821; WITHNER, 1988). Entretanto, diferem em alguns aspectos florais, sendo que *C. harrisoniana* possui o labelo geralmente mais comprido, a parte basal da pétala dorsal mais aberta, porção basal das pétalas mais estreitas e ligeira dilatação nos lobos laterais do labelo (VAN DEN BERG, 1996) (Figura 2).

Figura 2 - Flor da espécie *Cattleya loddigesii* Lindl. (esquerda) pertencente à população de Alfenas, MG e *C. harrisoniana* Bateman ex Lindl. (direita) exemplar da população de Cordovil, RJ
Foto: Thaís M. Tomé

Os aspectos fenológicos das plantas também são antagônicos, uma vez que *C. loddigesii*, geralmente, floresce nos meses de maio a agosto, enquanto *C.*

harrisoniana floresce entre novembro e março (WITHNER, 1988; VAN DEN BERG, 1996) (Figura 3), embora exista registro na literatura documentando que *C. loddigesii* possa florescer nas duas épocas do ano (HOENNE, 1949; PANSARIN; PANSARIN, 2010). A distribuição geográfica das espécies é considerada simpátrica adjacente, uma vez que *C. loddigesii* é comumente encontrada em Minas Gerais e regiões interioranas dos Estados do Paraná e São Paulo e, segundo Barbosa Rodrigues (1996), ocorre também no nordeste da Argentina, enquanto *C. harrisoniana* é predominante de regiões litorâneas dos Estados de Espírito Santo e Rio de Janeiro. Apesar disso, há evidências de uma larga faixa onde as espécies se sobrepõem no interior do Estado de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (VAN DEN BERG, 1996; VAN DEN BERG; MARTINS, 1998). Ambas são nativas da Mata Atlântica, ao passo que *C. loddigesii* é encontrada, majoritariamente, em matas de galeria, caracterizadas por regiões com temperaturas médias mais elevadas e climas mais secos em relação ao clima mais úmido e, relativamente, mais fresco do litoral (WITHNER, 1988; PANSARIN; PANSARIN, 2010).

Figura 3 - Fenologia das populações estudadas por van den Berg (1996). Gráfico superior esquerdo representa populações de *Cattleya loddigesii* do interior do Estado de São Paulo. Gráfico superior direito, populações de *C. loddigesii* do sul do Estado de Minas Gerais. Gráfico inferior, populações da espécie *C. harrisoniana*

Fonte: editado de van den Berg (1996)

Ambas as plantas são consideradas predominantemente alógamas e, por isso, necessitam de cruzamentos para a fecundação. Seus principais polinizadores observados e descritos na literatura são abelhas do gênero *Bombus* (PANSARIN; PANSARIN, 2010). Após a fecundação, as flores murcham e os frutos se desenvolvem. Os frutos característicos da maioria das orquídeas, são deiscentes e denominados cápsulas, onde armazenam grande quantidade de sementes semelhantes a pó (do inglês, *seed dust*). As sementes das orquídeas são fáceis de dispersar em longas distâncias, principalmente pelo vento, pois são minúsculas e podem atingir grandes alcances (ARDITTI; GHANI, 2000). No entanto, não possuem mecanismo simples de germinação, necessitando de condições favoráveis e do auxílio de fungos específicos para obterem sucesso germinativo (ARDITTI, 1967). Outro modo de dispersão em orquídeas ocorre por meio do pólen, que encontra-se

inserido em uma mistura cerosa denominado políneas (LINDLEY, 1821; WITHNER, 1988; DRESSLER, 1993). Para as espécies em estudo, e também típico de muitas *Cattleya*, as flores apresentam quatro políneas (WITHNER, 1988) e necessitam de polinizadores para o transporte do pólen, característico, na maioria delas, por abelhas (SMIDT et al., 2006; BUZZATO et al., 2010; PANSARIN; PANSARIN, 2010).

Esses fatores de dispersão, juntamente com os eventos de deriva e seleção tem sido importantes na busca da compreensão da distribuição e da estruturação espacial das populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Para muitas plantas, estudos concluem que o fluxo gênico é, geralmente, mais eficiente via pólen do que semente (DUMINIL et al., 2007; PALMA-SILVA, 2008; RODRIGUES, 2015), entretanto, ainda não se sabe exatamente qual é o mais eficiente para as duas plantas em estudo. Por isso, entender a forma como elas se dispersam é fundamental para explicar a história demográfica e a divergência ocorrida entre *C. harrisoniana* e *C. loddigesii* bem como a distribuição espacial das populações e traçar hipóteses que possam explicar as diferentes rotas evolutivas a que foram submetidas.

3.1.1.1 Hibridação e introgressão

À medida que estudos relacionados ao complexo de espécies de orquídeas são desenvolvidos, mais evidente é a possibilidade de ocorrência de híbridos entre elas (SANTOS, 2011; RODRIGUES, 2015), ainda mais quando o número de cromossomos nas espécies são idênticos, como ocorre com nas plantas de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* e na maioria das espécies do gênero ($2n = 40$), e talvez grande parte de subtribo Laeliinae (HOEHNE, 1949; TANAKA; KUMAMOTO, 1984). Embora o número de híbridos naturais e artificiais registrados em *Cattleya* seja expressivo (VAN DEN BERG, 2014), não há registros de híbridos entre as duas espécies, muito disso, pode ter a ver com a problemática de que a divergência em nível de espécie não está totalmente esclarecida.

Possíveis descontinuidades morfológicas e fenológicas encontradas por van den Berg e Martins (1998), sugerem que *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* possuem, cada qual, seu status específico. Diante disso, os autores encontraram populações com características de ambas as espécies sugerindo a ocorrência de populações introgridas. Segundo os autores, as plantas localizadas no município de São José dos Campos-SP, em sua maioria, apresentaram características morfométricas de *C.*

harrisoniana, entretanto os aspectos fenológicos dos indivíduos foram característicos das duas espécies, que florescem em diferentes épocas do ano (Figura 3). Já os indivíduos da população de Careaçu-MG foram semelhantes aos indivíduos da espécie *C. loddigesii*, mas a época de floração foi a mesma dos indivíduos da espécie *C. harrisoniana* (Figura 3). Apesar das características intermediárias das populações introgridas, o autor sugeriu que elas possuem relação mais próxima com *C. harrisoniana*, pois ambas possuem maior semelhança com populações dessa planta. Mais tarde, Santos et al. (2009), investigando a estruturação genética de populações das duas espécies com marcadores ISSR, reforçou a existência de diferenciação entre elas e também encontrou maior relação das populações híbridas com as populações de *C. harrisoniana* do que de *C. loddigesii*. Ademais, o autor também encontrou possíveis populações com traços de introgressão, como mostrado na Figura 4, mas que necessitam de maior investigação.

Figura 4 – Padrão de estruturação do estudo com marcadores ISSR (Santos et al., 2009) indicando diferenciação entre espécies, onde as plantas híbridas são mais próximas de *C. harrisoniana*. O agrupamento predominantemente da cor verde indica as populações da espécie *C. loddigesii* e o agrupamento da cor vermelho indica as populações de *C. harrisoniana* (Cordovil-RJ e Muqui-ES) e as populações introgridas de São José dos Campos-SP e Careaçu-MG

Fonte: van den Berg (2014)

Os eventos de introgressão, como observados por van den Berg (1996), podem ser explicados como a ocorrência de intensas trocas gênicas interespecíficas que resultam em grande mistura de genes provenientes do retrocruzamento do híbrido com seus parentais (RIDLEY, 2006). Além disso, se o evento de introgressão é contínuo os genes podem se mover além das fronteiras das espécies utilizando indivíduos, ou até mesmo populações híbridas, como pontes de fluxo gênico e, assim, manterem a conectividade entre elas, colonizar novas áreas antes não

habitadas e favorecer o surgimento de novas espécies (PALMA-SILVA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2010, 2013). Apesar da complexidade gênica que ocorre entre as populações nos eventos de introgressão, muitos dos genes específicos de cada espécie podem ser mantidos sem sofrer qualquer tipo de perda. Esse tipo de comportamento genético é conhecido como genoma poroso, onde a ocorrência de porções delimitadas do genoma responsáveis pela identidade das espécies é conservado (MINDER, 2007). Van den Berg (2013) percebeu esse tipo de evento nas populações de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*, uma vez que mesmo contendo um certo grau de mistura, a identidade delas parece não ter sido abalada.

3.2 Filogeografia

A filogeografia é definida como a correlação dos aspectos geográficos e genealógicos dos seres vivos a fim de inferir a história evolutiva entre e dentro de grupos relacionados (AVISE, 2000). Como o nome propõe, a filogeografia é responsável não somente pela relação de estudos filogenéticos entre táxons, mas também pelos componentes históricos que moldaram a distribuição geográfica das espécies (AVISE et al., 1987). Mais especificamente, podem-se inferir estudos filogeográficos com dados morfológicos, comportamentais, moleculares, por exemplo, através de uma perspectiva filogenética (AVISE, 2000). Dentro desse contexto, a filogeografia molecular é caracterizada por atuar nos processos de distribuição espacial de alelos cujas influências ambientais, ecológicas, e eventos históricos ajudaram a moldar a história dos seres vivos ao longo de milhares de anos (AVISE, 2000).

O Pleistoceno, há ~2 milhões – ~11.000 anos atrás, foi marcado por intensas oscilações glaciais (sendo a última entre 23.000-18.000 anos), interglaciais e movimento de tectônica de placas, que resultou em expansão, contração, fragmentação das florestas e, conseqüentemente, a redistribuição das espécies animais e vegetais atuais (PROVAN; BENNET, 2008; CARVALHO; ALMEIDA, 2013). Em áreas neotropicais, acredita-se que a origem da diversidade que existe se deve às mudanças ocorridas no Mioceno e no Pleistoceno, tornando-as conhecidas mundialmente pela gama de biodiversidade que apresentam em relação a outras regiões do planeta (DRESSLER, 1993; LEWINSOHN; PRADO, 2005; ANTONELLI; SANMARTIN, 2011). Por essa razão, uma das principais hipóteses debatidas para explicar essa grande biodiversidade existente é a teoria dos refúgios (BENNETT et

al., 1991). De acordo com a teoria, nos períodos de glaciação, as espécies ficavam isoladas em florestas fragmentadas por campos abertos para sobreviverem, o que afetou a distribuição espacial e a abundância das espécies em determinados locais como consequência de dispersões restritas, migrações e extinções (HAFFER, 1969). Consequentemente, as populações das espécies se separavam com o surgimento de barreiras e sofriam diferenciação devido ao impedimento do fluxo gênico entre elas, resultando em isolamento reprodutivo, divergência e especiação alopátrica (PETIT et al., 2003; HEWITT, 2001, 2004; SWENSON; HOWARD, 2005).

Carnaval e Moritz (2008) revelaram, através de uma modelagem paleoclimática, que houve a ocorrência de zonas de refúgio na Mata Atlântica (MA) no último glacial (~20 mil anos atrás) localizadas nos Estados da Bahia e Pernambuco. Além disso, eles inferiram uma possível instabilidade nas florestas da Mata Atlântica em São Paulo, mas que precisa ser melhor investigada. Valdez e D'Elia (2013) estudaram a filogeografia de *Akodon montensis* e observaram algumas descontinuidades na distribuição da espécie corroborando zonas de refúgio sugeridos por Carnaval-Moritz (2008). Van den Berg (1996) estudou a morfometria de 23 espécies de *Cattleya* e levantou a hipótese para uma zona de refúgio no sul do Estado de São Paulo, sendo necessários mais estudos para consolidar essa inferência. Apesar de trabalhos que corroboram a hipótese dos refúgios, algumas controvérsias são impostas para tentar elucidar se realmente é uma hipótese válida, tais como dados biogeográficos insuficientes, em que alguns estudos moleculares não corroboram a teoria (BUSH; OLIVEIRA, 2006; PINHEIRO et al., 2011; THOMÉ et al., 2014).

Estudos filogeográficos em espécies neotropicais têm sido importantes para testar zonas de refúgio na fauna e flora brasileira, e além disso, é possível inferir em outros padrões evolutivos que podem estar associados com a distribuição espacial das espécies (NOVAES et al., 2010; COOK et al., 2012; BRANDÃO, 2012; LIMA, 2012; ALVES, 2013; SCOTTI-SAINTAGNE et al., 2013; CORONADO et al., 2014; RUIZ-GARCÍA et al., 2015; MATOS et al., 2016). Entre as regiões mais estudadas se encontra a Mata Atlântica Brasileira, que possui grande parte dessa biodiversidade (CARNAVAL et al., 2009, COLOMBI et al., 2010; THOMÉ et al., 2010; PINHEIRO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011; BATALHA-FILHO et al., 2012; AMARO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2013; PINHEIRO et al., 2014; CARDOSO et al., 2015;

RODRIGUES et al., 2015; RODRIGUES, 2015). Nesse contexto, estudos envolvendo biogeografia e filogeografia de diferentes seres vivos apontam a uma cadeia de eventos evolutivos que podem ter ocorrido no passado e que são responsáveis pela distribuição atual das espécies nos dias de hoje (TURCHETTO-ZOLET, 2013). A partir dessa perspectiva, estudos filogeográficos tornaram-se bastante importantes e vem sendo cada vez mais promissores para testar hipóteses de processos evolutivos que ocorreram nas espécies, buscando as interações ecológicas relacionadas com os eventos geológicos, geográficos e as influências ambientais (HICKERSON et al., 2010). Ainda, podem servir de subsídio para corroborar, ou não, locais que possivelmente foram refúgios das espécies e inferir padrões biogeográficos históricos que refletem a biodiversidade atual (CARVALHO; ALMEIDA, 2013).

Apesar do aumento no interesse e incertezas resolvidas em estudos voltados às áreas neotropicais e em Orchidaceae em geral (ANTONELLI et al, 2010; SANTOS, 2011; TURCHETTO-ZOLLET et al., 2013; PINHEIRO et al., 2014; VAN DEN BERG, 2014; RODRIGUES, 2015; SALAZAR et al., 2016, entre outros), ainda há muito a se explorar nessas regiões, levando em conta a gama de diversidade que possuem. Além disso, nos últimos anos, as ferramentas utilizadas em estudos filogeográficos vêm ganhando forças e conseguindo alcançar maior número de dados e, para lidar com isso, conta com modelos estatísticos e *softwares* cada vez mais sofisticados para aproveitar o máximo de informações extraídas dos dados. Quando esses resultados são associados a outros estudos, é possível inferir em padrões biogeográficos e genealogias que foram responsáveis pela distribuição geográfica e especiação de grupos conhecidos atualmente. Desse modo, eles podem servir de apoio para entender a história ecológica e evolutiva dos seres vivos, inferir em histórias geológicas da Terra, auxiliar na classificação de táxons relacionados, estudos paleontológicos e apoiar estudos de genética da conservação na determinação de pontos prioritários da conservação *in situ* e *ex situ* (AVISE, 2000, 2008).

3.3 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são conhecidos por determinar pontos de referência nos cromossomos, os quais permitem desenvolver estudos em nível genético e conciliar com outros métodos existentes, tais como estudos morfológicos,

anatômicos, fisiológicos, entre outros (AVISE, 2004). Com eles, é possível determinar as estratégias adaptativas a diferentes ambientes e, ainda, inferir em processos evolutivos decorrentes de modificações em nível de genótipos (BECERRA; PAREDES, 2000). Os primeiros marcadores surgiram na década de 1960 e eram utilizados para inferir a variação genética de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; SOLTIS; SOLTIS, 1998). Duas décadas mais tarde, vieram os marcadores oriundos diretamente da molécula do DNA, juntamente com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS; FALONA, 1987), que revolucionou o campo da genética molecular. A partir disso, vieram outros marcadores com relevância em estudos moleculares e que, cada vez mais, vem aumentando a acurácia em pesquisas com plantas (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*; RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*; AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*; ISSR - *Inter Simple Sequence Repeats*; SSR - *Simple Sequence Repeats*; GBS - *Genotyping By Sequencing*; RadSeq - *Restriction Site-associated Sequencing*; e os marcadores extranucleares, provenientes de mitocôndrias - mtDNA; e cloroplastos - cpDNA).

Esses avanços da tecnologia molecular tornaram-se úteis em estudos de diversidade, estrutura genética e análises evolutivas em nível de indivíduos, populações e espécies, uma vez que pode-se inferir na complexidade comportamental dos genótipos ao longo do tempo (TAUTZ et al., 1986; WILLIAMS et al., 1990; GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ et al., 1994; VOS et al., 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; CAIXETA et al., 2006; DAVEY; BLAXTER, 2010; ELSHIRE et al., 2011).

A utilização de DNA plastidial (cpDNA) em análises genéticas também tem sido muito eficiente na elucidação de dados ecológicos e evolutivos em espécies vegetais. Geralmente, as sequências de DNA plastidiais empregadas em estudos filogeográficos têm como alvo as regiões intergênicas onde encontram maior variabilidade, sendo que o polimorfismo encontrado pode variar entre táxons diferentes (SHAW et al., 2005). Sua importância em estudos com plantas é explicada pela forma como são adquiridos os dados, pois possuem características apenas materna em muitos organismos, não apresentam recombinação e são muito frequentes nas células (PROVAN; BENNETT, 2008). O modo de herança uniparental é relevante para auxiliar nas relações entre dispersão de pólen e sementes no fluxo

gênico em plantas e é eficaz na investigação de processos demográficos históricos (McCAULEY, 1995; COZZOLINO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2011). Além disso, pelo fato do genoma do cloroplasto ser haploide, a deriva genética consegue atuar quatro vezes mais rápido comparado ao genoma nuclear e, consequentemente, os haplótipos são fixados mais rapidamente (HEDRICK, 2011).

Pinheiro (2009), em um estudo com seis populações das espécies de orquídeas, *Epidendrum fulgens* e *E. puniceoluteum*, enfatizou que a comparação entre dados de microssatélites nucleares e dados oriundos de regiões plastidiais é eficaz na elucidação de inferências de processos evolutivos, como isolamento reprodutivo em populações de uma determinada espécie e detecção de ploidia. Além do mais, tais marcadores são eficazes em estudos de biogeografia histórica, uma vez que podem ser comparados com outros estudos e serem úteis na reconstrução biogeográfica do passado (CARNAVAL et al., 2009). Ademais, é uma técnica eficiente na obtenção de polimorfismo entre espécies não sendo necessárias grandes quantidades de tecido vegetal e, ainda, dispensa metodologias trabalhosas como, por exemplo, a hibridização em Southern (PROVAN et al., 2001).

Diversas são as fontes de obtenção de sequências de plantas a partir de dados plastidiais em estudos evolutivos e taxonômicos, sendo que entre os mais utilizados estão, por exemplo, *rpl32-F-trnL*, *rps16-trnQ*, *ndhF-rpl32*, *trnT-psbD*, *ndhC-trnV*, *petA-psbJ*, *psbE-petL*, *atpl-atpH* (SHAW et al., 2005, 2007, 2014), embora a utilização de regiões cpDNA em estudos evolutivos e demográficos em plantas, bem como mtDNA em animais, venha sendo reduzida nos últimos anos comparados com DNA nuclear (GARRICK et al., 2015). Contudo, diversos estudos ainda se concentram em dados moleculares citoplasmáticos e, na maioria das vezes, combinados com DNA nuclear (PALMA-SILVA, 2009; NEUBIG et al., 2009; NOVAES et al., 2010; SANTOS, 2011; NOVAES et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; LONGO et al., 2014; PINHEIRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015).

Além dos cpDNA, SSR nuclear e afins, existem regiões no genoma que se tornaram amplamente úteis em estudos filogenéticos e filogeográficos. Uma dessas regiões é o DNA ribossomal – *Internal Transcribed Spacer* (ITS) – que apresenta características favoráveis em estudos evolutivos, pois é de herança biparental, altamente variável em orquídeas (DOUZERY et al., 1999; SMIDT, 2007; MONTEIRO, 2007) e possui inúmeras cópias no genoma, facilitando sua amplificação (VAN DEN HOF et al., 2008; ALVAREZ; WENDEL, 2003; FELINER;

ROSSELLO, 2007). A variabilidade encontrada na região ITS em geral é menor quando comparada aos outros genes do genoma nuclear. Isso ocorre devido à enorme quantidade de cópias que são homogeneizadas através de processos moleculares, como a conversão gênica e crossing over desiguais (ALVAREZ; WENDEL, 2003). Os ITS, no entanto, são criticados em alguns aspectos, entre eles, pela ocorrência de cópias parálogas, embora isso não pareça ser um problema recorrente em Orchidaceae.

O emprego de marcadores moleculares em estudos filogeográficos é cada vez mais amplo, entretanto, quando se usa apenas um tipo de marcador, pode-se subestimar a hipótese evolutiva da(s) espécie(s) refletindo somente a história do marcador, propriamente dito (EDWARDS; BEERLI, 2000). Além do mais, pode-se adquirir resultados discordantes devido a possíveis abordagens distintas entre a comparação dos marcadores. Por isso, atrelar estudos com marcadores de diferentes regiões do genoma, juntamente com o emprego da abordagem coalescente pode ser e vem sendo uma ferramenta importante na elucidação de histórias evolutivas das plantas (KUHNER, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi elaborado a partir do sequenciamento de regiões plastidiais e nucleares de populações de plantas de *Cattleya loddigesii*, *C. harrisoniana* e duas populações com graus de introgressão entre as duas espécies identificadas no estudo de van den Berg (1996), sugeridas como *C. harrisoniana*. Van den Berg e Martins (1998) não descartaram a possibilidade dessas duas populações serem possivelmente subespécies. Para facilitar a distinção das populações introgridas das demais, a identificação das populações introgridas foi dada pela sigla “Hib”, onde é melhor visualizado na Tabela 1. Foram amostrados de um a 14 indivíduos de 18 populações originadas de municípios dos Estados de São Paulo (nove populações), Minas Gerais (sete populações), Espírito Santo e Rio de Janeiro (ambos com uma população) (Tabela 1; Figura 5). Parte das coletas ocorreu em condições *ex situ*: em bancos de germoplasma ou bancos de DNA de orquídeas, tais como o Orquidário Frederico Carlos Hoehne do Instituto de Botânica de São Paulo, Orquidário Paulo Sodero Martins da ESALQ/USP, Banco de DNA do Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas, da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, BA), e *in situ*, em coletas realizadas na natureza.

Tabela 1 - Relação das populações amostradas, origem e fonte de obtenção das amostras, número de indivíduos e coordenadas geográficas das populações de *Cattleya loddigesii*, *Cattleya harrisoniana* e duas populações introgridas

Sigla da pop.	Espécie	População	Nº de indiv.	Localização		Altitude (m)	Voucher
				Longitude	Latitude		
H1	<i>C. harrisoniana</i>	Muqui, ES ³	8	-41.346944	-20.949722	260	Brieger Coll. 9482 (ESA)
H2	<i>C. harrisoniana</i>	Cordovil, RJ ³	8	-43.227778	-22.709444	25	Brieger Coll. 16023 (ESA)
Hib3	<i>C. harrisoniana</i>	S.J. dos Campos, SP ³	8	-45.901111	-23.224722	610	Brieger Coll. 5385 (ESA)
Hib4	<i>C. harrisoniana</i>	Careaçu, MG ³	7	-45.749167	-22.113056	912	Brieger Coll. 12516 (ESA)
L1	<i>C. loddigesii</i>	Tiradentes, MG ¹	8	-44.178056	-21.110278	965	Sem voucher (IBot1, 7923)
L2	<i>C. loddigesii</i>	Carrancas, MG ³	6	-44.5875	-21.466944	1050	Brieger Coll. 1821 (ESA)
L3	<i>C. loddigesii</i>	Alfenas, MG ²	10	-45.947222	-21.429167	800	Brieger Coll. 4457 (ESA)
L4	<i>C. loddigesii</i>	Ouro Fino, MG ³	4	-46.278611	-22.311389	1120	Brieger Coll. 12457 (ESA)
L5	<i>C. loddigesii</i>	Extrema, MG ³	6	-46.318889	-22.865833	1100	Brieger Coll. 13193 (ESA)
L6	<i>C. loddigesii</i>	Agudos, SP ³	8	-49.025278	-22.494167	640	Brieger Coll. 4531 (ESA)
L7	<i>C. loddigesii</i>	Brotas, SP ¹	8	-48.126667	-23.550833	740	Sem voucher (IBot1, 3525)
L8	<i>C. loddigesii</i>	Santa Maria da Serra, SP ⁴	14	-48.324444	-22.505	500	Sem voucher (ESALQ2, 34031)
L9	<i>C. loddigesii</i>	Iracemápolis, SP ⁴	10	-47.518611	-22.580556	672	Sem voucher (coll. pessoal)
L10	<i>C. loddigesii</i>	Piracicaba, SP ³	8	-47.520278	-22.746944	600	Brieger Coll. 2494 (ESA)
L11	<i>C. loddigesii</i>	Conchas, SP ³	10	-48.013611	-23.015833	550	Brieger Coll. 4566 (ESA)
L12	<i>C. loddigesii</i>	Porangaba, SP ¹	8	-48.125	-23.175833	670	Sem voucher (IBot1, 17025)
L13	<i>C. loddigesii</i>	Alambari, SP ¹	9	-47.898611	-23.550833	720	Sem voucher (IBot1, 2775)
L14	<i>C. loddigesii</i>	Rio Preto, MG ⁴	1	-43.826065	-22.076945	800	Sem voucher (Berg, van den, 2015)
TOTAL		-	131	-	-		

Fonte de obtenção das populações:

¹ Instituto de Botânica de São Paulo (IBot) – Orquidário Frederico Carlos Hoehne.

² Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ)/USP – Orquidário Paulo Sodero Martins.

³ Universidade Estadual de Feira de Santana - Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas.

⁴ Material coletado *in situ* (fragmento florestal).

Figura 5 - Mapa da distribuição das populações de *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana* utilizadas nesse estudo

4.1 Coleta e extração de DNA

Foram coletadas parte das folhas das plantas, as quais foram armazenadas em gel CTAB [30 mg CTAB, 350 mg NaCl, 0,7 mL de água destilada] contido em microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram posteriormente armazenados em geladeira por sete dias. O DNA de cada amostra foliar foi extraído seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com algumas modificações: maceração em 1,5 mL de STE (NaCl 5M, Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, pH 8.0) gelado e centrifugado; adição de tampão CTAB 3% (brometo de cetilmetil amônio) com polivinilamina (PVP); limpeza com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) adaptado para microtubos; limpeza do pellet realizada três vezes com álcool 70% e posterior suspensão em tampão TE (0,1 M EDTA pH 8,0); e adição de 1% de RNase em cada amostra incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. A concentração do DNA extraído foi quantificada com o auxílio do Lambda DNA (Invitrogen™) diluído em concentrações de 200ng/μL, 100ng/μL e 50ng/μL. Em seguida, todas as amostras foram submetidas a diluições para obter concentração padrão de 20ng/μL.

4.2 Marcadores moleculares

Com o intuito de identificar regiões variáveis para esse estudo, um total de 13 marcadores cpDNA e 5 marcadores de sequencias de região nuclear foram testados

(Apêndice A). A escolha desses marcadores foi baseada em trabalhos anteriores em que se mostraram propícios em estudos evolutivos no nível de populações e espécies em Orchidaceae (PINHEIRO et al., 2011, 2013, 2014; SANTOS, 2011; RODRIGUES et al., 2015).

4.3 Amplificação das regiões testadas

No processo de amplificação das regiões específicas nas amostras (PCR) foram utilizados diferentes métodos e concentrações de reagentes. Basicamente, o protocolo utilizado nas regiões de cpDNA (*rpl32-F-trnL*, *atpl-atpH*, *psbJ-petA*, *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*, *psbD-trnT*, *rpl16-intron*, *rpl32-ndhF*, *rpoB-trnC*, *rps16-trnk*, *rps16-trnQ*, *trnS-trnG* e *trnV-ndhC*) e *ycf1* (hypothetical chloroplast open reading frame 1) foi o kit Toptaq Master Mix (Qiagen) contendo 5 µL de Toptaq, 1,5 µL de H₂O do kit, 3 pmol de marcador *forward* mais 3 pmol de marcador *reverse*, 2 µL de aditivo baseado em trealose – TBT (SAMARAKOON et al., 2013) e 1 µL de DNA a 20 ng/µL, totalizando 10 µL. Para as regiões ITS (ITS17SE-ITS26SE) e ETS foi utilizado o mesmo protocolo de reagentes de cpDNA e *ycf1*, mas com acréscimo de aditivos para maior desempenho da reação (2% de DMSO, 1M de Betaína), obtendo volume final de 15 µL. Regiões nucleares XDH foram testadas com os seguintes reagentes: 1,5 µL de Tampão 10X (Tris-HCl 100 mM), 0,75 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,3 µL de dNTP 10mM, 2% de DMSO, 0,3 µL de TBT, 2 unidades de *Taq* Polimerase (Phoenix), 3 pmol de *primer forward* e 3 pmol de *primer reverse*, 1M de Betaína, 1 µL de DNA a 20ng/µL e completado com H₂O ultra pura (SIGMA) até 15 µL.

As reações de amplificação das regiões plastidiais e nucleares foram realizadas nos termocicladores Multigene Thermal Cyclers (Labnet International, Inc.) e BioRad no Laboratório de Genética Ecológica de Plantas (LAGEP), na ESALQ/USP, SP, e os termocicladores GeneAmp. PCR System 9700 e ESCO HEALTHCARE Swift-maxPro® no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL), na UEFS, BA. As etapas de desnaturação, amplificação e extensão para todos os marcadores estão descritas na Tabela 2. Para a quantificação das reações, os produtos de PCR foram submetidos a gel de agarose 1% corados com GelRed ou brometo de etídio (4µL/mL), sendo então comparadas com ladder 100 pb (Life Technologies, Carlsbad city, CA, USA) para verificar se a região foi amplificada adequadamente a partir dos dados da literatura de cada marcador.

Todas as amostras amplificadas foram purificadas com PEG (11% Polietileno glycol 8000/NaCl 2,5 M) e etanol (PAITHANKAR; PRASAD, 1991) para a retirada das impurezas de resíduos de primers e dNTPs que podem influenciar nas etapas seguintes. Posteriormente, as amostras secaram em temperatura ambiente e foram ressuspensas na mesma quantidade do volume final da reação (10-15 μL), com exceção das amostras que tiveram concentração mais baixa (abaixo de 10 ng/ μL), que foram ressuspensas a 8 μL e amostras muito concentradas (superior a 50ng/ μL), que foram ressuspensas a 20 μL . Em seguida, as reações limpas foram submetidas a uma nova quantificação por espectrofotometria usando um NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham city, MA, USA). Finalmente, as amostras foram sequenciadas com o kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com protocolo padrão para todas as reações em volume final de 10 μL : 1,75 μL de tampão 5x próprio para sequenciamento; primer forward e reverse 0,5 μL a 10/15 pmol em tubos separados; 0,5 μL de BigDye; 5 μL de trealose 10%; e 2,25 μL de reação de PCR (obedecendo a proporção de 3ng para cada 100pb do marcador) mais água Milli-Q. Após sequenciadas, as amostras foram submetidas à limpeza com Isopropanol 80%, descansando no escuro por 20 minutos, em seguida centrifugadas e lavadas com Etanol 70% por duas vezes. Finalmente, as reações de sequenciamento foram desidratadas e submetidas ao sequenciador automático ABI3130 XL no LAMOL/UEFS, BA.

4.4 Edição de sequências e alinhamento

As sequências de DNA plastidiais e nucleares foram editadas com o auxílio do *software* PreGap4 para a exclusão das extremidades e o *software* Gap4 para a realização do consenso *forward* e *reverse* de cada amostra. Os dois *softwares* utilizados na edição pertencem ao pacote computacional Staden (STADEN et al., 1998). O alinhamento das sequências foi feito a partir do algoritmo Muscle (EDGAR, 2004) incorporado no *software* MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), com posterior correções manuais e, por último, foram calculados os níveis de polimorfismo entre os indivíduos pelo *software* DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009).

4.5 Análises de dados

Com o intuito de obter respostas sobre a delimitação das espécies e o grau de parentesco dos híbridos em relação às espécies desse estudo, algumas das análises foram realizadas considerando as possíveis distribuições das populações híbridas, tanto em *C. loddigesii*, quanto em *C. harrisoniana*. A forma de como os dados foram considerados para cada situação encontra-se detalhada na descrição de cada análise especificamente.

A fim de eliminar possíveis interferências em alguns resultados coalescentes, foi feita a análise de detecção de possíveis eventos recombinantes entre as sequências com o *software* RDP4 versão Beta 4.72 (MARTIN, 2015). A presença de recombinação genética nas sequências pode subestimar as análises genealógicas das populações, pois esses eventos permitem que novos haplótipos possam ser criados, interferindo na diversidade genética existente de forma similar à mutação, mas que não são levados em conta na abordagem coalescente (TEMPLETON, 2006).

4.5.1 Diversidade genética

A partir dos dados das sequências obtidas, foram calculadas medidas de diversidade genética, tais como número de haplótipos (h), tamanho da sequência (pb), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (H_d), diversidade nucleotídica (π) e níveis de estruturação populacionais (AMOVA), com o modelo de distância par-a-par, computadas no *software* Arlequin versão 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Além disso, foram calculados os testes de neutralidade de D de Tajima e F_u 's para verificar se houve expansão populacional.

4.5.2 Estruturação populacional

As análises de variância molecular (AMOVA) foram realizadas separadamente para cpDNA e ITS considerando três possíveis arranjos para as populações e espécies: I) Foram consideradas todas as populações em apenas um grupo (sem discriminar espécies); II) Os dados foram analisados separando as espécies em grupos distintos, considerando as duas populações de *C. harrisoniana* mais os híbridos (H1 e H2 + Hib3 e Hib4) no primeiro grupo e as populações de *C. loddigesii* no segundo grupo, onde foram descartadas as populações de Rio Preto-MG para cpDNA e ITS e Brotas-SP para ITS; III) As populações híbridas (Hib3 e

Hib4) foram inseridas no grupo das *C. loddigesii* e um segundo grupo foi formado pelas duas populações de *C. harrisoniana* (H1 e H2). Em seguida, foram feitas análises da AMOVA para *C. harrisoniana* e *C. loddigesii* separadamente para cada região, onde foram avaliadas quatro possíveis análises: 1) Apenas populações de *C. harrisoniana* puras (H1 e H2); 2) Populações de *C. harrisoniana* mais as populações híbridas (H1 e H2 + Hib3 e Hib4); 3) Apenas populações de *C. loddigesii*; e 4) Populações de *C. loddigesii* mais as populações híbridas (Hib3 e Hib4).

As análises de estrutura populacional foram determinadas através de métodos bayesianos, a fim de delimitar os grupos geneticamente relacionados, usando o *software* Structure 2.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007). Para a análise do Structure foram realizadas simulações independentes para cada valor definido previamente de número de agrupamento K (K de 1 a 10). Em cada simulação, foram feitas 500.000 iterações de MCMC com um descarte inicial (burn-in) de 100.000. A análise foi realizada utilizando o modelo de ancestralidade *admixture* e frequências alélicas correlacionadas, sendo que o número mais provável de agrupamentos foi estimado pelo método ΔK de Evanno et al. (2005) através do *software* online Structure Harvester 0.6.93 (EARL; VON HOLDT, 2012), considerando todas as populações em conjunto.

4.5.3 Distribuição haplotípica

Os dados dos haplótipos contidos nas populações das espécies *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* foram gerados a partir do *software* DNAsp (LIBRADO; ROSAS, 2009). Em seguida, a distribuição espacial de cada haplótipo nas populações foi representada em gráficos de pizza, juntamente com as coordenadas geográficas gerada através do *software* online PhyloGeoViz (TSAI, 2011). Esse programa é especificamente útil em análises de distribuição espacial de haplótipos de sequências de DNA, onde vem sendo utilizado em estudos filogenéticos e filogeográficos (MARKOLF; KAPPELER, 2013; PEREIRA et al., 2013; BELL et al., 2015; ZINCK; RAJORA, 2016) e, por último, a edição final do mapa de distribuição dos haplótipos foi realizada no *software* Google Earth. As distribuições, frequências e relações dos haplótipos nas diferentes espécies e regiões geográficas foram comparadas com outros trabalhos e discutidas adiante.

A análise filogeográfica de clado aninhados (*Nested Clade Phylogeographic Analysis* – NCPA) (TEMPLETON; SING, 1993; TEMPLETON et al., 1998) foi realizada para compreensão dos principais padrões e processos responsáveis pela distribuição dos haplótipos obtidos. Para tal foi utilizado o *software* TCS para geração dos haplótipos e, em seguida, foram computados pelo *software* GEODIS v 2.6 (POSADA et al., 2000). Para inferir na demografia a partir de NCPA, as informações geográficas da distribuição espacial dos haplótipos são necessárias. Para isso, dois valores são utilizados para representar tais informações: a distância do clado (Dc) e a distância do clado aninhado (Dn), onde o primeiro mede a amplitude geográfica de um clado em relação à sua dispersão geográfica, e o segundo calcula a distância que um haplótipo ou clado está diante dos haplótipos ou clados que ele se encontra evolutivamente mais relacionado (TEMPLETON, 2001). Para a análise da construção dos clados foram considerados 10.000 permutações aleatórias para calcular associações significativas entre distâncias genéticas e a distribuição geográfica dos haplótipos. A partir disso, a inferência de processos históricos que expliquem os padrões de distribuição de haplótipos foi realizada utilizando a chave de inferência disponível no site da GEODIS (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>).

4.5.4 Proporção de fluxo gênico via pólen X sementes

Para avaliar os níveis de dispersão do fluxo gênico via pólen e semente, foram utilizadas medidas de Φ_{ST} da AMOVA computadas no *software* Arlequin. Para isso, foram considerados os dados de ITS para regiões nucleares e regiões cpDNA como dados citoplasmáticos. O cálculo foi baseado na fórmula de Ennos (1994), adaptado por Petit (2005) (Fórmula 1), que calcula a proporção de dispersão preferencial pólen-semente, onde foram considerados os valores para as duas espécies e também para as populações dentro das espécies.

$$\text{Fórmula 1. Fluxo pólen/Fluxo sementes} = \frac{\left[\left(\frac{1}{F_{st}(B)} - 1 \right) - 2 \left(\frac{1}{F_{st}(M)} - 1 \right) \right]}{\left(\frac{1}{F_{st}(M)} - 1 \right)}$$

onde, $F_{st}(B)$ e $F_{st}(M)$ são níveis de diferenciação populacional para os marcadores nuclear ITS (biparental) e cpDNA (materno), respectivamente.

4.5.5 Estimativa do tempo de divergência

Para inferir a datação molecular dos haplótipos foram geradas duas árvores genealógicas a partir de marcadores cpDNA e ITS, onde foi utilizado o *software*

BEAST 1.8.2 (DRUMOND et al., 2012). Além dos haplótipos utilizados nas espécies em estudo, foram adicionadas sequências de *Cattleya forbesii*, *C. intermedia*, *C. amethystoglossa*, *C. tenuis*, *Guarianthe skinneri* e *Brassavola tuberculata* representando o outgroup. As sequências de DNA das espécies do outgroup foram adquiridas do genbank para as regiões ITS e *rpl32-trnL*. O estoque de DNA dessas amostras já sequenciadas encontram-se armazenadas no banco de germoplasma do LAMOL/UEFS. Entretanto, foi necessário sequenciar as mesmas amostras do outgroup para a região *atpI-atpH*, uma vez que não haviam sido sequenciadas anteriormente para essa região.

Para o marcador ITS, as regiões ITS1 e ITS2 foram fundidas em uma partição, tendo sido utilizado o modelo GTR+I+G, enquanto que para cpDNA os dois marcadores utilizados foram também agrupados em apenas uma partição e foi utilizado o modelo HKY+I+G. Para ambos os marcadores, foram aplicados os parâmetros do relógio estrito com estimativa de taxa para divergência do gênero *Cattleya* a partir da árvore de Laeliinae (12-10Ma) (Figura 1) (Santos et al., dados não publicados) e o modelo coalescente *constant size*, onde priorizou-se as estimativas somente nos haplótipos das espécies *C. harrisoniana* e *C. loddigesii*. Além do modelo coalescente *constant size*, foram testados outros três modelos (*Logistic*, *Exponential* e *Expansion Growth*) com os mesmos parâmetros com o intuito de avaliar qual seria o mais adequado para este estudo.

A partir dos diferentes modelos foram comparados os Bayes Factors (BF), onde os *logs treelikelihood* e *coalescent* foram somados manualmente e comparados pelo software Tracer 1.6 (RAMBAUT et al., 2013). A comparação dos modelos se mostrou mais adequada quando utilizado o *constant size* e, por isso, este modelo foi empregado neste estudo, tanto para o marcador ITS, quanto para cpDNA. Foram feitas 20 milhões de cadeias (mcmc) com uma árvore amostrada a cada 1000, totalizando 20 mil árvores e um *burnin* de 25% (5 mil árvores). Os consensos para os dois tipos de marcadores foram gerados com o mesmo *burnin* no software Figtree 1.4.2 (RAMBAUT, 2012) e as árvores foram editadas com o auxílio do software Inkscape 0.91.

4.5.6 Demografia histórica

Com o intuito de investigar a demografia histórica das espécies, foram realizadas análises *Bayesian Skyline plot* (DRUMMOND et al., 2005), em que foram consideradas as populações híbridas em *C. loddigesii* e, posteriormente em *C. harrisoniana*. O modelo coalescente foi utilizado nessas análises para as duas regiões (cpDNA e ITS) combinadas. Foram corridas 20 milhões de cadeias de Markov (MCMC), amostrando a cada 1.000 árvores com o *software* BEAST 1.8.2 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007; DRUMMOND et al., 2012), em que se utilizou os modelos de evolução GTR+I+G para ITS e o modelo HKY+I+G para cpDNA. Além disso, foi assumido um relógio molecular estrito, com a taxa de evolução do ITS (dados diploides) de $4,2287 \times 10^{-9}$ e $6,58 \times 10^{-10}$ para cpDNA (dados haploides). Os dados foram então testados para convergência, o que indicou um *burnin* de 5.000 árvores, e então calculou-se o Skyline com o *software* TRACER 1.6 (RAMBAUT et al., 2013). O gráfico final do Skyline foi editado com o auxílio do pacote computacional R.

A análise de tamanhos efetivos populacionais (N_e) e taxas de migração (M) foi realizada usando o *software* MIGRATE-N 3.6.1 (BEERLI, 2004). Este é um programa que utiliza o modelo coalescente e modelos mutacionais para inferir os parâmetros genéticos populacionais. O modelo mutacional utilizado pelo programa é semelhante ao HKY, onde assume que cada base tem 0,25 de probabilidade de sofrer mutação (BEERLI, 2009). O programa possui dois métodos de análise, um deles é a máxima verossimilhança e o outro é por inferência bayesiana, sendo este último utilizado neste estudo. A escolha pela inferência bayesiana é justificada por apresentar algumas vantagens em relação à máxima verossimilhança, tais como inserir uma distribuição a priori e mais adequada para trabalhar com dados esparsos (BEERLI, 2006).

Doze modelos diferentes foram testados nas populações visando avaliar o número provável de espécies, populações, o grau de parentesco das populações introgridas (Hib3 e Hib4) e se há indícios de isolamento por distância: I) modelo panmítico, considerando todas as populações sem discriminar espécies; II) considerando duas populações panmíticas, uma da espécie *C. harrisoniana* e a outra *C. loddigesii* com as populações híbridas (Hib3 e Hib4); III) considerando duas populações panmíticas, uma da espécie *C. harrisoniana* com os híbridos (Hib3 e Hib4) e a outra da espécie *C. loddigesii*; IV) considerando três populações panmíticas, sendo uma de cada espécie e a terceira somente dos híbridos; V) *full*

migration, sem distinção de espécies; VI) *full migration* com IBD (isolamento por distância), onde leva em conta a distribuição geográfica das populações; VII) *full migration* discriminando espécies e os híbridos como *C. loddigesii*; VIII) *full migration* discriminando espécies com os híbridos como *C. harrisoniana*; IX) *full migration* discriminando as espécies e os híbridos como outro grupo; X, XI e XII) esses três últimos modelos foram semelhantes aos VII, VIII e IX, respectivamente, mas considerando IBD.

A corrida MCMC foi feita a 400 mil passos com burnin de 40 mil utilizando o modelo de isolamento por distância (IBD). Para todos os modelos foram corridas quatro cadeias com diferentes temperaturas (1.0; 1.5; 3.0; 1000000.0). A comparação dos modelos foi feita através dos valores da autocorrelação do MCMC para θ (theta, valor estimado pelo programa) e M (taxas de migração) (ESS), priorizando os valores maiores que 200, e os valores *a priori*, na qual os valores devem ser próximos (BEERLI, 2010). Finalmente, para o cálculo do tamanho efetivo populacional (N_e) a partir de θ , foram considerados os valores da mediana da distribuição *a posteriori*, aplicada a fórmula $N_e = \theta / 4\mu$ para dados nucleares diplóides e $N_e = \theta / 2\mu$ para dados haplóides, onde μ é a taxa de mutação por geração. Para isso, foi assumida uma taxa de mutação/ano de 4.2287×10^{-9} para ITS e $6,58 \times 10^{-10}$ para cpDNA, calculada na análise de datação molecular, e um tempo de geração de 10 anos.

4.5.7. Reconstrução filogeográfica

Para entender melhor como a dinâmica filogeográfica atuou nas populações das espécies *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* foi feita uma análise para estimar a dinâmica espaço-temporal das populações a partir de dados de dispersão populacional. Para isso, foi utilizado o *software Beast* 1.8.2 (DRUMOND et al., 2012) com o modelo coalescente *constant size* e relógio estrito com estimativa de taxa de $4,2287 \times 10^{-9}$ para ITS e $6,58 \times 10^{-10}$ para cpDNA. Além disso, foram geradas 50 milhões de cadeias (MCMC) com uma árvore amostrada a cada 1000, totalizando 50 mil árvores e um *burnin* de 10%, em que se utilizou os modelos de evolução GTR para ITS e o modelo HKY para cpDNA. O modelo coalescente GMRF *Bayesian Skyride* foi utilizado para as análises *a priori* (MININ et al., 2008). Posteriormente, os dados foram testados para convergência, o que indicou um *burn-in* de 5.000 árvores.

A partir disso, a árvore de máxima credibilidade foi gerada utilizando o *software* TreeAnnotator v1.8.2. A reconstrução espaço-temporal foi, então, inferida com o *software* SPREAD 1.0.6 (BIELEJEC et al., 2011). O suporte para as taxas de transição foi avaliada usando o teste de *Bayes Factor* (BF) no próprio *software*, considerando apenas as transições maiores que 3. Finalmente, foi gerado um mapa com a possível reconstrução filogeográfica das populações das espécies pelo Google Earth (<http://earth.google.com>) em formato kml, onde o mapa foi editado utilizando o *software* Qgis (<http://qgis.osgeo.org>).

5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos marcadores

Inicialmente, foram testados 18 marcadores moleculares, sendo que para o marcador nuclear ribossomal ITS (nrDNA) e os plastidiais *rpl32-trnL* e *atpl-atpH* (cpDNA) foram encontrados níveis satisfatórios de polimorfismo nas espécies em estudo. Para alcançar maior acurácia nos dados foram utilizadas apenas sequências com grande nitidez, onde apresentaram picos grandes e com alto nível de confiabilidade (Figura 6). Apesar das amostras sequenciadas com cpDNA e ITS serem as mesmas, o número de indivíduos em ITS foi menor (Tabela 2). Isso ocorreu devido à detecção de picos duplos em grande parte das sequências o que inviabilizou o uso do mesmo número de amostras. Na Figura 6 há um exemplo do resultado dos eletroferogramas com prováveis polimorfismos na região ITS, onde a porção inicial era de boa qualidade e da metade em diante houve a presença dos picos duplos. Finalmente, os marcadores cpDNA, *rpl32-trnL* e *atpl-atpH*, foram concatenados e, dessa forma, utilizados em todas as análises.

O resultado obtido pela análise de detecção de recombinantes não mostrou possíveis eventos de recombinação no alinhamento das sequências estudadas. Dessa forma, é possível descartar qualquer hipótese de que alguma divergência e incongruências entre árvores em análises coalescentes utilizadas nesse estudo seja fruto de recombinação.

Figura 6 - **(A)** Eletroferograma parcial de um indivíduo de Porangaba-SP, ilustrando um exemplo de boa qualidade do sequenciamento para o marcador ITS. **(B)** Eletroferograma que corresponde à sequência parcial de um indivíduo da população de Brotas-SP, ilustrando a presença de picos duplos no sequenciamento

Tabela 2 - Análise de diversidade genética para os marcadores cpDNA e ITS utilizados para as espécies *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana*

	cpDNA	ITS
Número amostral (N)	131	108
Tamanho da sequência (pb)	1546	612
Nº de sítios polimórficos (S)	54	20
Nº de haplótipos (h)	15	24
Diversidade haplotípica (Hd)	0,6573	0,8941
Diversidade nucleotídica (π)	0,0024	0,0073
Tajima D	0.5170*	0.2777*
Fu's FS	-0.3530*	-5.1254*

* valores não significativos para $p < 0,05$

5.2 Análise da diversidade genética

Os índices de diversidade genética foram calculados para as sequências de cpDNA e ITS separadamente, onde utilizou-se 17 e 16 populações, respectivamente (Tabela 2). A população de Rio Preto-MG foi excluída dessas análises por apresentar apenas uma amostra nesse local e a população de Brotas-SP foi excluída da análise com ITS, por conter apenas dois indivíduos sequenciados nessa região. Apesar da população de Ouro Fino-MG também ter poucos indivíduos (4 em cpDNA e 3 em ITS) ela não foi excluída das análises devido à amostragem não apresentar diferença significativa nos testes em que foi e não foi descartada. Dentre

as amostras analisadas o número de sítios polimórficos (S) entre os marcadores foi maior em cpDNA (Tabela 2). Apesar disso, os dados de ITS resultaram em maior número de haplótipos, bem como nos valores de diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π), em comparação com o cpDNA. Os valores de D de Tajima não detectou possíveis eventos de expansão populacional, enquanto que para Fu's FS os valores foram negativos, indicando expansão de populações, mas não significativos para $p > 0,05$.

Para as análises individuais das populações (Tabela 3), os níveis de diversidade haplotípica para cpDNA variaram de 0 nas populações de Careaçu-MG (Hib4), Carrancas-MG (L2) e Extrema-MG (L5) a 0,833 em Ouro Fino-MG (L4) e a diversidade nucleotídica variou de 0 (Hib4, L2, L5) a 0,005 (L4) (Tabela 3). Para ITS os níveis de diversidade de haplótipos variaram de 0,333 em Conchas-SP (L11) a 1,0 em Ouro Fino-MG (L4) e a diversidade nucleotídica variou de 0,001 nas populações de Cordovil-RJ (H2), Alfenas-MG (L3), Extrema-MG (L5) e Conchas-SP (L11) a 0,008 nas populações de Tiradentes-MG (L1) e Ouro Fino-MG (L4).

Tabela 3 - Análise de diversidade genética para *Cattleya harrisoniana* (H1 e H2), populações introgridas (Hib3 e Hib4) e *C. loddigesii* (L1 a L13) para os marcadores cpDNA e ITS com a composição dos haplótipos nas populações, o número de indivíduos analisados (N), e os índices de diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π)

Sigla pop.	cpDNA				ITS			
	Haplótipos (Hap)	N	Hd	π	Haplótipos (Hap)	N	Hd	π
H1	1-2-3	7	0,523	0,001	1, 2, 3, 4,	7	0,810	0,002
H2	1-4-5-6	7	0,809	0,002	1, 2	7	0,476	0,001
Hib3	1-7	8	0,250	0,001	5, 6, 7	8	0,750	0,003
Hib4	1	7	0,000*	0,000*	6, 8, 9	6	0,600	0,003
L1	1-8-9	8	0,678	0,002	6, 8, 10, 11	8	0,750	0,008
L2	1	5	0,000*	0,000*	6, 12, 13, 14	5	0,900	0,005
L3	1-8	10	0,355	0,001	5, 6, 8	7	0,666	0,001
L4	1-8-10	4	0,833	0,005	6, 15, 16	3	1,000	0,008
L5	1	6	0,000*	0,000*	5, 6	5	0,400	0,001
L6	1-8-10	7	0,523	0,003	6, 15, 17, 18	7	0,810	0,005
L7	1-7-8-10	8	0,785	0,004	-	-	-	-
L8	1-8-11-12-13	9	0,805	0,002	6, 18, 19, 20	9	0,583	0,004
L9	7-8	9	0,388	0,003	15, 18, 21	6	0,733	0,004
L10	1-7-8-11-14	8	0,785	0,004	6-13-18-20-22	8	0,857	0,005
L11	1-8	10	0,466	0,002	18, 21	6	0,333	0,001
L12	8-15	8	0,250	0,001	5-6-18-21-23	8	0,857	0,007
L13	1-8	9	0,555	0,001	10-13-17-21-23-24	8	0,892	0,006

* valores não significativos para $p < 0,001$.

5.3 Análises de estruturação genética das populações

A AMOVA apresentou níveis de variação genética dentro das populações maiores do que entre as populações para cpDNA e ITS, onde para ITS a diferença na variação foi menor. Adicionalmente, os valores referentes à diferenciação das populações foi alto tanto para ITS, como para cpDNA, tendo como possível consequência a baixa ocorrência de fluxo gênico entre elas (Tabelas 4 e 5). Entretanto, ao comparar os resultados da AMOVA par a par para todas as populações (Apêndice B), é possível notar que o valor de estruturação em algumas populações são baixos, o que indica presença de fluxo gênico entre elas, tanto para cpDNA, quanto para ITS.

Tabela 4 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para regiões cpDNA considerando todas as populações sem discriminar espécies

Fonte de variação	GL	Porcentagem de variação	Índice de fixação	P valor
Entre populações	16	26,83%	F_{ST} : 0,268	0,000
Dentro de populações	113	73,17%		
Total	129			

Tabela 5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para a região ITS considerando todas as populações sem discriminar espécies

Fonte de variação	GL	Porcentagem de variação	Índice de fixação	P valor
Entre populações	15	45,95%	F_{ST} : 0,459	0,000
Dentro de populações	92	54,05%		
Total	107			

Ao considerar a estruturação para cada espécie separadamente, os valores foram bastante distintos, inclusive quando as populações introgridas (Hib3 e Hib4) foram agrupadas como *C. harrisoniana* e, depois, quando foram agrupadas com *C. loddigesii*. O nível de variação genética entre as espécies foi baixo, quando se considerou as populações Hib3 e Hib4 como *C. harrisoniana* para cpDNA, e moderado para ITS (Tabelas 6 e 7). Entretanto, os níveis de diferenciação entre populações, dentro das espécies e a diferenciação dentro de populações foram altos, tanto para cpDNA, como para ITS. Em seguida, quando as populações Hib3 e

Hib4 foram consideradas como sendo *C. loddigesii*, a diferenciação entre as espécies foi maior para ITS (59,8%) e pouca diferenciação foi observada para cpDNA (4,5%) (Tabelas 8 e 9).

Tabela 6 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) realizada para marcadores cpDNA considerando as populações introgridas como sendo *Cattleya harrisoniana* mais as populações de *C. loddigesii*

Fonte de variação	GL	Porcentagem de variação	Índice de fixação	P valor
Entre espécies	1	6,61%	F_{CT} : 0,066	0,000
Entre populações dentro de espécies	15	23,27%	F_{SC} : 0,249	0,000
Dentro de populações	113	70,12%	F_{ST} : 0,298	0,000
Total	129			

Tabela 7 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) realizada para marcadores ITS considerando as populações introgridas como sendo *Cattleya harrisoniana* mais as populações de *C. loddigesii*

Fonte de variação	GL	Porcentagem de variação	Índice de fixação	P valor
Entre espécies	1	12,83%	F_{CT} : 0,128	0,000
Entre populações dentro de espécies	14	37,23%	F_{SC} : 0,426	0,000
Dentro de populações	92	49,96%	F_{ST} : 0,500	0,069
Total	107			

Tabela 8 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) realizada para marcadores cpDNA considerando as populações introgridas como *Cattleya loddigesii* mais as populações de *C. harrisoniana*

Fonte de variação	GL	Porcentagem de variação	Índice de fixação	P valor
Entre espécies	1	4,46%	F_{CT} : 0,044	0,0000
Entre populações dentro de espécies	15	24,97%	F_{SC} : 0,261	0,0000
Dentro de populações	113	70,57%	F_{ST} : 0,294	0,000
Total	129			

Tabela 9 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) realizada para marcadores ITS considerando as populações introgridas como *Cattleya loddigesii* mais as populações de *C. harrisoniana*

Fonte de variação	GL	Porcentagem de variação	Índice de fixação	P valor
Entre espécies	1	59,79%	F_{CT} : 0,597	0,0000
Entre populações dentro de espécies	14	10,68%	F_{SC} : 0,265	0,0000
Dentro de populações	92	29,54%	F_{ST} : 0,704	0,006
Total	107			

As análises da AMOVA para cada espécie em particular foram feitas de forma similar às análises anteriores, onde as populações Hib3 e Hib4 foram consideradas como sendo *C. harrisoniana* e, posteriormente, como sendo *C. loddigesii*. Para regiões cpDNA onde se considerou Hib3 e Hib4 como sendo *C. harrisoniana*, a variação dentro das populações foi maior do que entre as populações, e o valor de F_{ST} foi moderado em *C. harrisoniana* e alto em *C. loddigesii* (Tabela 10). Entretanto, para ITS a variação foi maior entre as populações do que dentro das populações de *C. harrisoniana*, e o valor de F_{ST} foi contrastante quando se considerou as populações híbridas e quando não as considerou. E, não houve grande diferença na estruturação quando as populações híbridas foram incluídas na espécie e quando não incluídas.

Tabela 10 - Análises da Variância Molecular (AMOVA) realizadas para cada espécie separadamente a partir de marcadores cpDNA e ITS

cpDNA	Variação entre populações	Variação dentro de populações	Índice de estruturação (F_{ST})
<i>C. harrisoniana</i> + Hib3 e Hib4	14,79%	85,21%	0,148
<i>C. loddigesii</i>	25,49%	74,51%	0,255
<i>C. harrisoniana</i>	14,84%	85,16%	0,148
<i>C. loddigesii</i> + Hib3 e Hib4	26,83%	73,17%	0,268
ITS			
<i>C. harrisoniana</i> + Hib3 e Hib4	78,72%	21,28%	0,787
<i>C. loddigesii</i>	22,59%	77,41%	0,225
<i>C. harrisoniana</i>	-6,06%	106,06%	-0,060
<i>C. loddigesii</i> + Hib3 e Hib4	26,08%	73,92%	0,260

A estruturação a partir da análise bayesiana para as regiões de cpDNA avaliada pelo método de Evanno et al. (2005) sugeriu que três clusters são o que melhor explica a proximidade genética entre os indivíduos das populações. Por outro lado, dois clusters são o que melhor explica a relação genética entre os indivíduos para as regiões de ITS e dois clusters para as regiões combinadas (Figura 7).

Figura 7 - Gráficos gerados a partir do Structure Harvester online (Link: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) onde se avaliou o número ótimo de populações (K) de Evanno, a partir de (A) regiões plastídias, (B) nucleares e (C) combinadas para *Cattleya harrisoniana* e *C. loddigesii*

Os gráficos bar plots representados na Figura 8 correspondem ao agrupamento dos indivíduos em relação às proximidades genéticas. Para os dados de cpDNA (Figura 8A), as populações H1 (Muqui-ES), H2 (Cordovil-RJ), Hib3 (São José dos Campos-SP), Hib4 (Careacú-MG), L2 (Carrancas-MG), L3 (Alfenas-MG), L5 (Extrema-MG), L6 (Ouro Fino-MG) L8 (Santa Maria da Serra-SP, L10 (Piracicaba-SP), L11 (Conchas-SP) formaram um grupo (cor verde), que se mostrou dominante para a maioria dos indivíduos nessas populações. Um segundo agrupamento (cor azul) foi gerado incluindo as populações L12 (Porangaba-SP), dominante nos indivíduos das populações de L1 (Tiradentes-MG), L11(Conchas-SP) e L13 (Alambari-SP). Por último, um terceiro grupo (cor vermelha) foi formado abrangendo a população de Iracemápolis-SP (L9) agrupada com alguns indivíduos de L10 (Piracicaba-SP) e presentes também em indivíduos das populações H2, Hib3, L4, L6, L7 e L8.

Figura 8 - Gráfico da estruturação das populações de *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana* com marcadores cpDNA (A), ITS (B) e combinados (C), gerados a partir da análise bayesiana e selecionados a partir do valor ótimo de K de Evanno (2005)

A análise bayesiana para os dados de ITS agrupou os indivíduos em dois grupos (Figura 8B), onde os indivíduos das populações H1 (Muqui-ES), H2 (Cordovil-RJ) e L11 (Conchas-SP), possuem maior proximidade genética e, por isso, estão em um grupo (vermelho), sendo exclusivos em todos os indivíduos amostrados. Em um segundo grupo os indivíduos dos municípios geográficos Hib3 (São José dos Campos-SP), L3 (Alfenas-MG) e L5 (Extrema-MG) se agruparam geneticamente também de forma que abrangeu todos os indivíduos (verde). No entanto, o restante das populações teve indivíduos com similaridade genética de ambos os grupos (verde e vermelho), sendo as populações Hib4 (Careacú-MG), L1

(Tiradentes-MG), L2 (Carrancas-MG), L4 (Ouro Fino-MG), L6 (Agudos-SP), L8 (Sta Ma. da Serra-SP), L9 (Iracemápolis-SP), L10 (Piracicaba-SP), L12 (Porangaba-SP) e L13 (Alambari-SP).

O resultado da análise bayesiana para os dados de marcadores combinados, resultou em dois agrupamentos genéticos distintos (Figura 8C). A maioria das populações apresentou similaridade com os dois grupos, sendo que apenas H1, H2, L8 e L9 tiveram a maioria dos indivíduos em um grupo (verde), enquanto que a maioria dos indivíduos de Hib3, Hib4, L1, L2, L3, L4 e L5 foram agrupados geneticamente no outro grupo (vermelho). Portanto, as populações de *C. harrisoniana* (H1 e H2), mais L8 e L9 se separaram das demais populações.

Os resultados dos gráficos B e C da Figura 8 mostram que as populações do litoral, que são exclusivamente da espécie *C. harrisoniana*, são mais próximas geneticamente das populações do Estado de SP do que de Minas Gerais (com exceção de São José dos Campos-SP), enquanto as populações previamente definidas como introgridas são mais similares às populações de MG. Já nos dados de cpDNA (Figura 8A), os indivíduos foram, em sua maioria, bastante próximos geneticamente. Com exceção apenas de grande parte da população de Iracemápolis-SP (L9) que se mostraram significativamente distintos das demais (vermelho), e com poucos indivíduos de outras populações geneticamente similares.

5.4 Distribuição dos haplótipos nas populações

Nas análises de distribuição dos haplótipos é possível observar que as populações de *C. harrisoniana* H1 (Muqui-ES) e H2 (Cordovil-RJ) estão mais isoladas em relação às outras populações sendo que para ITS não foram detectados haplótipos em comum com as populações de *C. harrisoniana* (Figuras 9 e 10). Esses resultados corroboram os níveis de estruturação entre espécies encontradas nas análises da AMOVA para as populações H1 e H2. Além disso, as populações introgridas (Hib3 e Hib4) compartilharam haplótipos com as populações de *C. loddigesii*. Adicionalmente, a distribuição haplotípica representada no mapa evidencia ampla distribuição de alguns haplótipos para cpDNA e maior estruturação para ITS. Além disso, as populações pertencentes ao Estado de SP apresentaram maior número de haplótipos exclusivos, tanto para cpDNA, quanto para ITS. Para ITS, as populações H1 e H2 compartilharam haplótipos apenas entre elas, enquanto

que nos Estados de SP e MG, há ocorrência de compartilhamento de haplótipos, mas com alguns exclusivos para cada Estado (Figura 10).

Figura 9 - Distribuição dos haplótipos construída a partir das regiões de cpDNA e dados geográficos das populações em estudo. Populações de *Cattleya harrisoniana*: H1-Muqui-ES; H2-Cordovil-RJ; Hib3-Careaçu-MG; Hib4-São José dos Campos-SP. Populações de *C. loddigesii*: Minas Gerais: L1-Tiradentes; L2-Carrancas; L3-Alfenas; L4-Ouro Fino; L5-Extrema e L14-Rio Preto. São Paulo: L6-Agudos; L7-Brotas; L8-Santa Maria da Serra; L9-Iracemápolis; L10-Piracicaba; L11-Conchas; L12-Porangaba; L13-Alambari. Os diferentes haplótipos estão representados por cores distintas

Figura 10 - Distribuição dos haplótipos construído a partir da região de ITS e dados geográficos de populações em estudo. Populações de *Cattleya harrisoniana*: H1-Muqui-ES; H2-Cordovil-RJ; Hib3-Careaçu-MG; Hib4-São José dos Campos-SP. Populações de *C. loddigesii*:

Minas Gerais: L1-Tiradentes; L2-Carrancas; L3-Alfenas; L4-Ouro Fino; L5-Extrema. São Paulo: L6-Agudos; L8-Santa Maria da Serra; L9-Iracemápolis; L10-Piracicaba; L11-Conchas; L12-Porangaba; L13-Alambari. Os diferentes haplótipos estão representados por cores distintas

Considerando os critérios de Gardall e Templeton (1993) para a análise filogeográfica dos clados aninhados, os haplótipos mais ancestrais são os que possuem maior frequência, geralmente com grande número de conexões. Além disso, pressupõe-se que os haplótipos terminais são os mais recentes na genealogia, que estão presentes com menor frequência e podem, conseqüentemente, ser raros. Para os dados de cpDNA houveram três níveis de agrupamento dos clados (Figura 11), sendo que o Hap_1 (H1, H2, Hib3, Hib4, L1, L2, L3, L4, L5 L6, L8, L10, L11 e L13) foi o que conferiu o enraizamento do clado devido à sua maior abrangência nos quatro Estados geográficos amostrados (ES, MG, RJ e SP) com exceção apenas das populações de L7 (Brotas-SP) e L12 (Porangaba-SP). O Hap_8 (L1, L3, L4, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14) foi o segundo mais abrangente, considerando a maioria das populações dos Estados de MG e SP, deixando de fora apenas as populações L2 (Carrancas-MG), L5 (Extrema-MG) e as populações dos Estados de ES (H1 – Muqui-ES) e RJ (H2- Cordovil-RJ). O resultado da chave de inferência para as regiões de cpDNA indicou que no clado 2-1 houve expansão com intervalos contíguos, e no clado 2-2 houve fluxo gênico restrito com isolamento por distância (dispersão restrita por distância).

Figura 11 - Representação da análise de clados aninhados (NCPA) para os marcadores cpDNA. Os haplótipos de maior tamanho correspondem ao maior número de indivíduos. De dentro para fora, cada haplótipo é circulado de maneira que os mais próximos ficam unidos (contorno preto contínuo), enquanto que os clados maiores (tracejados) correspondem ao conjunto de clados menores mais próximos

No gráfico de clados aninhados da região ITS o enraizamento do clado foi dado pelo hap_6 (Hib3, Hib4, L1, L2, L3, L4, L5, L6, L8, L10, L12), com exceção apenas das populações H1 (Muqui-ES), H2 (Cordovil-RJ), L9 (Iracemópolis-SP), L11 (Conchas-SP) e L13 (ALambari-SP), sugerindo ser o mais ancestral (Figura 12). O segundo haplótipo mais frequente e, por isso, o segundo mais ancestral foi o Hap_18, onde encontram-se populações apenas do Estado de SP (L6, L8, L9, L10, L11 e L12), com exceção apenas das populações Hib3 (São José dos Campos-SP) e L13 (Alambari-SP). O Hap_8 foi o terceiro mais frequente, contudo sua posição foi terminal, indicando ser um haplótipo com grandes chances de dispersão rápida e recente. O Hap_1 (clado 1-10), como quarto mais frequente, apresentou características exclusivas, abrangendo apenas os haplótipos da espécie *C.*

harrisoniana H1 (Muqui-ES) e H2 (Cordovil-RJ), inclusive seus terminais (clados 1-6 e 1-7). A chave de inferência sugerida pela análise NCPA na região ITS, foi que o clado 1-1 e 2-4 apresentaram expansão com intervalos contíguos; no clado 1-2 houve fluxo gênico restrito com isolamento por distância (dispersão restrita por distância encontrada similarmente em espécies assexuadas); e o clado 1-4 apresentou indícios de fragmentação alopátrica. No cladograma geral a chave de inferência sugeriu que houve restrito fluxo/dispersão, mas com alguma dispersão de longa distância sobre as zonas intermediárias não ocupadas pelas espécies ou, ainda, o fluxo gênico passado seguido de extinção de populações intermediárias. Nos demais clados não houve rejeição da hipótese nula.

Figura 12 - Representação da análise de clados aninhados (NCPA) para os marcadores ITS. Os haplótipos de maior tamanho correspondem ao maior número de indivíduos. De dentro para fora, cada haplótipo é circulado de maneira que os mais próximos ficam unidos (contorno preto contínuo), enquanto que os clados maiores (tracejados) correspondem ao conjunto de clados menores mais próximos

5.5 Proporção do fluxo gênico via pólen X sementes

Para o resultado geral dos valores de Φ_{ST} de marcadores plastidiais e nuclear, a proporção do fluxo gênico via pólen e semente foi de -1,56. Esse valor sugere que a dispersão via sementes foi ligeiramente mais eficiente do que pólen. Entretanto, ao

analisar os índices de Φ_{ST} para cada espécie em particular, a proporção do fluxo gênico foi diferente. Primeiramente, ao considerar as populações puras (H1 e H2) da espécie *C. harrisoniana*, tem-se uma proporção de fluxo gênico via pólen pouco mais eficiente do que sementes (0,721). Contudo, ao considerar as populações introgridas (Hib3 e Hib4) como sendo *C. harrisoniana*, a proporção do fluxo via semente é mais eficiente (-1,95). Já para a espécie *C. loddigesii* não houve diferença quando consideradas as populações híbridas (-0,958) e quando não as considerou (-0,818).

5.6 Estimativa do tempo de divergência

Os resultados das análises de datação molecular mostraram que as espécies mais próximas genealogicamente de *C. harrisoniana* e *C. loddigesii* são as espécies *C. forbesii* e *C. intermedia* (Figuras 13 e 14). Para os haplótipos de cpDNA a divergência entre *C. forbesii* – *C. intermedia* e *C. harrisoniana* – *C. loddigesii* foi há cerca de 3,5 milhões de anos. Entretanto, para dados de ITS essa divergência aparentou ser mais recente, sendo datada há aproximadamente 1,8 milhões de anos. Em se tratando das duas espécies em estudo, os haplótipos mais basais surgiram em meados de 2,2 milhões de anos para cpDNA. O haplótipo mais ancestral para regiões plastidiais foi o Hap_4, caracterizado pela população H2 (Cordovil-RJ), seguido pelos haplótipos Hap_3 e Hap_14 que compõem as populações H1 (Muqui-ES) e L10 (Piracicaba-SP), respectivamente (Figura 13). Na região ITS os dados de ancestralidade dos haplótipos apontaram que a diversificação teve início a partir de 1,5 milhões de anos, sendo os haplótipos Hap_10 (L1 e L13), Hap_11 (L1) e Hap_24 (L13) os mais basais pertencentes às populações de Tiradentes-MG (L1) e Alambari-SP (L13) (Figura 14).

Figura 13 - Datação molecular dos 15 haplótipos das espécies *Cattleya harrisoniana* e *C. loddigesii* obtidos com marcadores cpDNA mais o grupo externo. A barra inferior indica o tempo em milhões de anos atrás. A barra azul observada em cada nó corresponde ao intervalo de confiança de 95%

Figura 14 - Datação molecular dos 24 haplótipos das espécies *Cattleya harrisoniana* e *C. loddigesii* obtidos a partir de regiões ITS mais o grupo externo. A barra inferior indica o tempo em milhões de anos atrás. A barra azul observada em cada nó corresponde ao intervalo de confiança de 95%

Na calibração das árvores de estimativa de tempo de divergência para as duas regiões distintas, foi utilizado dados da árvore filogenética gerada para Laeliinae em Santos; van den Berg (dados não publicados), onde foi estimada a divergência dos gêneros, inclusive de *Cattleya*. Entretanto, os valores em milhares de anos das duas árvores geradas para esse estudo (para cpDNA e ITS) não obtiveram a mesma idade de divergência comparado à árvore filogenética de Laeliinae para o nó de *Cattleya*. Uma das explicações plausíveis para essa discordância, é que para gerar a árvore filogenética de Laeliinae, o modelo utilizado foi o de especiação de Yule, enquanto que para as árvores de estimativa do tempo

de divergências obtidas neste estudo, foram geradas utilizando o modelo coalescente, portanto, modelos distintos.

5.7 Demografia histórica

Para as análises bayesianas realizadas no software Migrate-N, a comparação de modelos usando Bayes Factor (BF) para inferir qual modelo se encaixa melhor na hipótese de que pode haver uma, duas ou três espécies está descrita na Tabela 11. Dentre todos os testes elaborados, o melhor modelo foi o que considerou duas espécies (*C. loddigesii* e *C. harrisoniana*), com exceção apenas do modelo com estruturação das populações, que mostrou que o modelo mais adequado é de que há uma espécie.

Tabela 11 - Comparação dos modelos usando Bayes Factor (BF) para inferir na quantidade provável de espécies para os três modelos testados: Panmítico, Estruturação das populações e Estruturação das populações considerando isolamento por distância (IBD)

Modelos panmíticos					
Modelos	Bezier (ImL)	Diferença	Expoente	Probabilidade do modelo	Classificação
Uma espécie	-3169,8	-19,23	4,4516E-09	4,45E-09	4
Duas espécies: <i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>	-3150,57	0	1	9,99E-01	1
Duas espécies: <i>C. loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i> + híbridos	-3159,43	-8,86	1,42E-04	1,42E-04	3
Três espécies	-3158,47	-7,9	3,71E-04	3,71E-04	2
Menor valor	-3150,57	-	1,00E+00	-	-
Modelos com estruturação das populações					
Modelos	Bezier (ImL)	Diferença	Expoente	Probabilidade do modelo	Classificação
Uma espécie	-3014,38	0	1	1	1
Duas espécies: <i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>	-3176,1	-161,72	5,8331E-71	5,83306E-71	4
Duas espécies: <i>C. loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i> + híbridos	-3083,92	-69,54	6,2974E-31	6,29741E-31	2
Três espécies	-3172,52	-158,14	2,0925E-69	2,09252E-69	3
Menor valor	-3014,38	-	1	-	-
Modelos de populações estruturadas com IBD					
Modelos	Bezier (ImL)	Diferença	Expoente	Probabilidade do modelo	Classificação
Uma espécie	-2866,42	-108,2	1,0217E-47	1,02173E-47	4
Duas espécies: <i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>	-2758,22	0	1	1	1
Duas espécies: <i>C. loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i> + híbridos	-2857,34	-99,12	8,9687E-44	8,96873E-44	3
Três espécies	-2827,46	-69,24	8,5006E-31	8,50061E-31	2
Menor valor	-2758,22	-	1	-	-

A comparação dos modelos testados para avaliar a qual espécie as populações introgridas estão mais relacionadas, mostrou que *C. loddigesii* possui maior proximidade genética com as populações introgridas Hib3 e Hib4 e não com *C. harrisoniana* (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação dos modelos usando Bayes Factor (BF) para inferir o grau de parentesco das populações introgridas (Hib3 e Hib4) para os modelos: Panmítico, Estruturação das populações e Estruturação das populações considerando isolamento por distância (IBD)

Modelos panmíticos					
Modelos	Bezier (ImL)	Diferença	Expoente	Probabilidade do modelo	Classificação
<i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>	-3150,57	0	1	1	1
<i>C. loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i> + híbridos	-3159,43	-8,86	1,42E-04	1,42E-04	2
Menor valor	-3150,57		1		
Modelos com estruturação das populações					
Modelos	Bezier (ImL)	Diferença	Expoente	Probabilidade do modelo	Classificação
<i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>	-3083,92	0	1	1	1
<i>C. loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i> + híbridos	-3176,1	-92,18	9,26264E-41	9,26264E-41	2
Menor valor	-3083,92		1		
Modelos de populações estruturadas com IBD					
Modelos	Bezier (ImL)	Diferença	Expoente	Probabilidade do modelo	Classificação
<i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>	-2758,22	0	1	1	1
<i>C. loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i> + híbridos	-2827,46	-69,24	8,50061E-31	8,50061E-31	2
Menor valor	-2758,22		1		

Os valores da comparação dos modelos para inferir se as populações encontram-se estruturadas ou se estão em panmixia encontram-se descritos na Tabela 13. Segundo a classificação obtida através do Bayes Factor (BF), as populações se encontram diferenciadas e, conseqüentemente, não há incidência de populações panmíticas.

Tabela 13 - Comparação dos modelos usando Bayes Factor (BF) para inferir se as populações apresentam padrões panmíticos ou se encontram estruturadas: Panmítico X Estruturação

Modelos	Bezier (lnL)	Diferença	Expoente	Probabilidade do modelo	Classificação
2 populações panmíticas: <i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>	-3150,57	-66,65	1,1331E-29	1,1331E-29	2
2 populações panmíticas: <i>C. loddigesii</i> e <i>C. harrisoniana</i> + híbridos	-3159,43	-75,51	1,6085E-33	1,6085E-33	3
Populações estruturadas de <i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>	-3083,92	0	1	1	1
Populações estruturadas de <i>C. loddigesii</i> e <i>C.</i> <i>harrisoniana</i> + híbridos	-3176,1	-92,18	9,2626E-41	9,2626E-41	4
Menor valor	-3083,92		1		

O resultado do teste para verificar se as populações estruturadas seguem o modelo de isolamento por distância, pode ser observado na Tabela 14. Segundo os dados da comparação dos modelos as populações consideradas estruturadas obedecem ao modelo de isolamento por distância, indicando que a distância da população influencia a estruturação entre elas. Quanto mais distante a população estiver, maior será a diferenciação.

Tabela 14 - Comparação dos modelos usando Bayes Factor (BF) para inferir se a estruturação das populações segue o modelo de isolamento por distância (IBD)

Modelo	Bezier ImL	diferença	exp	prob modelo	Classificação
Populações estruturadas sem discriminar espécies	-3014,38	-147,96	5,51809E-65	5,51809E-65	2
Populações estruturadas geral com IBD sem discriminar espécies	-2866,42	0	1	1	1
Menor valor	-2866,42		1		
Considerando 2 espécies: <i>C. loddigesii</i> + híbridos e <i>C. harrisoniana</i>					
Populações estruturadas	-3083,92	-325,7	3,5505E-142	3,5505E-142	2
Populações estruturadas com IBD	-2758,22	0	1	1	1
Menor valor	-2758,22		1		
Considerando 2 espécies: <i>C. harrisoniana</i> + híbridos e <i>C. loddigesii</i>					
Populações estruturadas	-3176,1	-348,64	3,8688E-152	3,8688E-152	2
Populações estruturadas com IBD	-2827,46	0	1	1	1
Menor valor	-2827,46		1		
Considerando 3 espécies: <i>C. loddigesii</i>, <i>C. harrisoniana</i> e híbridos					
Populações estruturadas	-3172,52	-315,18	1,3154E-137	1,3154E-137	2
Populações estruturadas com IBD	-2857,34	0	1	1	1
Menor valor	-2857,34		1		

Dos diferentes modelos testados para as análises de N_e e N_m , o que mais se adequou aos dados foi o que considera duas espécies separadas, *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*, com populações estruturadas, obedecendo o modelo de isolamento por distância e as populações introgridas mais próximas geneticamente de *C. loddigesii*.

Os valores do tamanho efetivo populacional (N_e) encontrados nas populações foram bastante variáveis (Tabela 15). Embora tenham sido observadas diferenças no número de indivíduos efetivos entre as regiões de DNA plastidiais e nuclear, foi possível observar uma proporção similar da quantidade de indivíduos ao comparar algumas das populações. Por exemplo, a população L8 foi a que teve o menor número do tamanho efetivo nas duas regiões, enquanto que a população H1 foi a que apresentou a maior taxa de N_e para cpDNA e ficou entre os mais numerosos para ITS. De forma geral, para regiões cpDNA o tamanho efetivo variou de pouco mais de 21 mil em L8 (Santa Maria da Serra-SP) até mais de 6 milhões de indivíduos

em H1 (Muqui-ES). Para a região nuclear ITS, o número de indivíduos variou de aproximadamente 3 mil na população L8 a mais de 251 mil em L11.

Tabela 15 - Tamanho efetivo populacional (N_e) em populações de *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana* para regiões cpDNA concatenadas e ITS

Pop.	N_e	
	cpDNA	ITS
H1	6864741,64	323385,44
H2	379939,21	13183,72
Hib3	34194,53	4906,95
Hib4	2065729,48	278454,37
L1	1670592,71	257585,07
L2	1994680,85	309196,68
L3	1792173,25	329711,26
L4	2134118,54	286731,15
L5	29255,32	307245,73
L6	1781914,89	243396,32
L8	21656,53	3369,83
L9	1938829,79	258353,63
L10	1723784,19	295421,76
L11	2212386,02	358857,33
L12	2139057,75	251673,09
L13	1698328,27	282001,56

Os resultados obtidos para o número de migrantes nas populações foram assimétricos, tanto para cpDNA, quanto para ITS. Na Tabela 16, encontra-se os valores maiores que 10 de N_m entre as populações. É possível observar um padrão do número de migrantes saindo, principalmente, das populações do Estado de MG (L1, L2, L3 e L4) e se dispersando para as populações do Estado de SP (L6, L9, L10, L11 e L12), tanto para cpDNA concatenado, quanto ITS. Para as populações de *C. harrisoniana*, nota-se maior número de indivíduos migrantes da população de Cordovil-RJ (H2) para Muqui-ES (H1).

Figura 15 - Número de indivíduos migrantes (Nm) para marcadores cpDNA e ITS. O eixo X indica o fluxo da migração, onde a seta aponta para a população recebedora de migrantes. O eixo Y indica o número de indivíduos migrantes em uma geração de 10 anos

Para as análises de expansão populacional ilustrada nos gráficos *bayesian Skyline* aparentemente as populações se expandiram a aproximadamente 100 mil anos atrás. Os gráficos A e C da Figura 15 ilustram a rápida expansão da espécie *C. loddigesii* sem considerar as populações híbridas e considerando as populações híbridas, respectivamente. Nas populações de *C. harrisoniana* houve uma ligeira expansão ao considerar apenas as populações puras (H1 e H2) (Figura 15 B), onde o número de indivíduos após a expansão foi de aproximadamente 200 mil. Entretanto, ao considerar as populações híbridas como *C. harrisoniana*, houve um aumento do número de indivíduos de cerca de 500 mil antes da expansão, sendo que após a expansão esse número passou para aproximadamente 700 mil indivíduos.

Figura 16 - Gráficos Skyline de marcadores cpDNA e ITS combinados. O eixo X corresponde ao tempo de coalescência e o eixo Y expressa o tamanho populacional. A linha pontilhada indica a condição do tamanho populacional com relação ao tempo decorrido. A área em cinza corresponde ao intervalo de confiança de 95%. Os gráficos A e C correspondem às populações da espécie *Cattleya loddigesii* sem as populações híbridas de Careaçu-MG e S. J. dos Campos-SP e considerando-as, respectivamente. Os gráficos B e D são da espécie *C. harrisoniana* sem as populações híbridas e com as populações híbridas, respectivamente

5.8 Reconstrução filogeográfica

As análises de reconstrução filogeográfica mostraram que grande dispersão ocorreu, tanto do norte para o sul, como do sul para o norte (Figura 16). A população L13 (Alambari-SP) foi a população que mais se dispersou, seguida pela população L1 (Tiradentes-MG). Além disso, a população L13 da espécie *C. loddigesii* se dispersou para a população híbrida Hib3, juntamente com a população H2 (Cordovil-RJ), favorecendo a dispersão em direção ao litoral. A população híbrida Hib3 parece ter se dispersado em direção à população Hib4, adentrando o Estado de Minas Gerais. Ademais, a população de Alfenas-MG (L3) também se dispersou para a população Hib4.

A dispersão das populações do Estado de São Paulo para o norte ocorreu cerca de 750 mil anos atrás até meados de 500 mil anos. Nesse período, além da dispersão para o Norte, ocorreram também dispersões entre as populações do Estado de SP. Em aproximadamente 300 mil anos atrás as populações do Estado de MG, parecem ter se dispersado em direção Sul para o Estado de São Paulo. Além disso, as populações do litoral de *C. harrisoniana* (H1 e H2) possivelmente se dispersaram entre elas há cerca de 400 mil anos e a população de Hib3 antecedeu a dispersão até Cordovil-RJ e Muqui-ES por volta de 500 mil anos atrás.

Figura 17 - Mapa de reconstrução filogeográfica obtidos através de dados cpDNA e ITS combinados para as espécies *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana*, simulando a ocorrência de dispersões entre 750 mil anos até o presente

6 DISCUSSÃO

6.1 Diversidade genética

Para os índices de diversidade genética encontrados neste estudo obteve-se maior polimorfismo na região nuclear ribossomal ITS do que nas regiões cpDNA concatenadas, concordando com os estudos de Rodrigues (2015). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que regiões nucleares são herdadas de forma biparental nos indivíduos, aumentando o nível de variação, comparado ao genoma haploide de regiões cloroplastidiais em plantas. Um estudo similar do complexo de espécies vegetais do gênero *Helichrysum* (MORAIRA, 2014) encontrou níveis de diversidade genética similares aos desse estudo para região ITS, no entanto, para cpDNA os valores da diversidade haplotípica foram menores. Ribeiro et al. (2011) encontraram altos níveis de diversidade nucleotídica para cpDNA, maiores do que os encontrados neste estudo. Na espécie *Epidendrum firmum*, os índices de diversidade genética para cpDNA encontrados por Kartzinel et al. (2013) foram similares aos encontrados neste estudo e ligeiramente maiores do que os índices encontrados por Pinheiro et al. (2011) com populações de *Epidendrum fulgens*. O mesmo foi observado para a região ITS, onde os índices de diversidade foram bastante similares aos de Rodrigues (2015), com exceção do número de haplótipos que foi menor. Portanto, as regiões cpDNA e ITS utilizadas no presente trabalho foram consistentes com o nível de polimorfismo encontrado em outros trabalhos, o que os tornam eficientes na elucidação da diversidade genética para as populações de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*.

6.2 Divergência entre linhagens de *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*

O pleistoceno, marcado por intensos acontecimentos biogeográficos importantes (BEHLING, 2002), foi também caracterizado pela possível divergência das espécies desse estudo. Os diferentes modelos testados por inferência bayesiana por meio do software Migrate-N para inferir na divergência das plantas mostraram que duas espécies são o que melhor explica a relação entre *C. loddigesii*, *C. harrisoniana* e as populações introgridas (Hib3 e Hib4). Esses resultados são consistentes com van den Berg e Martins (1998), que, a partir de dados morfológicos, fenológicos e distribuição geográfica, também sugeriram que *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* possuem, cada uma, seu status específico. Além disso,

as análises de estruturação inferidas pela AMOVA e atribuição de indivíduos, para dados de regiões ITS e combinadas bem como pela distribuição dos haplótipos no mapa corroboram essa hipótese. As populações de *C. harrisoniana* se mostraram bastante diferenciadas das demais. Apesar disso, as análises de estimativa de tempo de divergência para ITS, juntamente com as análises de NCPA, divergiram parcialmente as populações de *C. harrisoniana* e *C. loddigesii* em clados distintos, mantendo apenas um haplótipo de *C. loddigesii* no mesmo clado de *C. harrisoniana*. Isso pode ter ocorrido devido à possível introgressão entre as populações (ALVAREZ; WENDEL, 2003) ou também à possível origem híbrida de uma das espécies com alguma outra espécie que ocorre em simpatria, tais como *C. intermedia* e *C. forbesii*, que, além de tudo, possui relações próximas, sendo as quatro espécies integrantes do mesmo subgênero (*Intermediae*) (VAN DEN BERG, 1996; SANTOS, 2011). Outro cenário favorável para o surgimento dessas espécies é a segregação transgressiva, onde possivelmente a espécie mais ancestral, antes da divergência, ocupou um novo nicho e, com o passar do tempo, esta foi se tornando uma nova espécie (SEEHAUSEN, 2004).

A estimativa do tempo de divergência entre haplótipos de cpDNA datou a divergência há mais de dois milhões de anos, contudo, não detectou a separação em nível de espécies. Além disso, as análises bayesianas de atribuição de indivíduos inferidas pelo software Structure para dados de cpDNA não estruturou as populações de espécies distintas, agrupando as populações de *C. harrisoniana* (H1 e H2), consideradas puras nesse estudo, com outras populações de *C. loddigesii*. O mesmo ocorreu com os resultados da análise de NCPA. Isso pode indicar que, matrilinearmente, não houve grande diferenciação entre *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*. O modo de herança uniparental e conservado dos plastídios e a ocorrência de polimorfismos transpecíficos pode ter influenciado a junção das genealogias dos haplótipos, tanto de cpDNA quanto de ITS, entre as duas espécies (AVISE, 2009; TEMPLETON, 2006). O polimorfismo transpecífico é caracterizado pelo compartilhamento de haplótipos entre espécies distintas provenientes de ancestrais em comum entre elas. Isso pode ser oriundo de eventos coalescentes que são mais facilmente detectados em espécies recentemente divergidas ou parcialmente divergidas (TEMPLETON, 2006). Além disso, se a origem das espécies for precedida de hibridação ancestral seguida por radiação adaptativa, essas podem

manter o compartilhamento de haplótipos idênticos com a espécie mãe, mantendo muitas vezes fixados nas espécies divergidas (SEEHAUSEN, 2004).

Os resultados da árvore genealógica haplotípica para cpDNA indicaram que o haplótipo mais ancestral é caracterizado pela população de Cordovil-RJ, seguida por Muqui-ES e Piracicaba-SP. Sendo assim, neste caso, as populações do litoral (Estados de ES e RJ) (*C. harrisoniana*) parecem ser as mais ancestrais, seguidas pelas populações do Estado de SP, Piracicaba-SP e Porangaba-SP. A árvore de divergência de haplótipos para a região ITS sugere que as espécies começaram a divergir por volta de 1 milhão e 500 mil anos, onde os haplótipos mais ancestrais dataram cerca de 400 mil anos, abrangendo as populações de Tiradentes-MG e Alambari-SP.

Ao comparar os resultados das árvores de estimativa de tempo de divergência para as duas regiões, é possível observar que elas são inconsistentes. Estudos relacionados com casos de incongruências filogenéticas e filogeográficas entre regiões cloroplastidiais e nucleares na literatura são evidenciados em orquídeas (VAN DEN BERG 2000, 2009; SANTOS, 2011). Uma das explicações para as inconsistências nas árvores pode ter sido pelo fato de que regiões diferentes do DNA possuem histórias evolutivas distintas (MADDISON, 1997). Levando em conta que o genoma cloroplastidial possui taxa de mutação menor do que o nuclear, passível de eventos recombinantes e, consequentemente, mais conservado, pode justificar a idade mais ancestral na divergência dos haplótipos detectadas pela árvore para a região cpDNA. Além disso, a incongruência na comparação das árvores pode ser devido à evolução em concerto, onde as milhares de cópias da região ITS no genoma podem ter mascarado a divergência dos haplótipos ao eliminar grandes quantidades de eventos mutacionais (ALVAREZ; WENDEL, 2003). Ademais, a ocorrência de processos que envolvem cruzamentos interespecíficos, como hibridação e introgressão, são também grandes responsáveis pela presença de incongruências (FEHRER et al., 2007). Se houve hibridação em espécies ancestrais e, posteriormente, uma radiação adaptativa, a investigação de diferentes regiões que sofreram com a instabilidade pode gerar dados conflitantes (SEEHAUSEN, 2004).

Inferir na idade estimada das espécies é complicado, uma vez que mais estudos são necessários para comprovar o tempo de existência histórica dos

haplótipos. Apesar disso, os resultados obtidos das análises de estimativa de tempo de divergência, NCPA para ITS e dispersão espaço-temporal suportaram a hipótese de que a espécie *C. loddigesii* é mais ancestral do que *C. harrisoniana*. Por outro lado, ao considerar que a origem das espécies do subgrupo *Intermediae* pode ter sido a partir do Vale do Paraíba e divisa dos Estados de RJ/SP (FOWLIE, 1977), é possível também que a espécie *C. harrisoniana* seja a mais ancestral, uma vez que essa hipótese pode ser corroborada pela análise de estimativa de tempo de divergência para cpDNA e com a inferência de van den Berg (1996), onde sugeriu que *C. harrisoniana* tenha surgido no pleistoceno e poderia ser uma espécie mais ancestral do que *C. loddigesii*, podendo ser considerada paleoendêmica. Entretanto, uma abordagem mais completa com novos marcadores, metodologias e maior amostragem são necessários para, de fato, verificar qual das espécies são mais ancestrais.

6.3 Hibridação e introgressão

Estudos voltados para a investigação da detecção de zonas híbridas e eventos de introgressão são importantes para a evolução das espécies uma vez que podem desencadear modificações nas paisagens biogeográficas, mudar a conexão das populações, afetar barreiras genéticas, alterar a diversidade genética e permitir a ocorrência de eventos de especiação (PINHEIRO et al., 2010, 2013; BIERNE et al., 2011; DOMINGUES et al. 2012; GAGNAIRE et al., 2013). Além disso, podem servir como pontes de fluxo gênico entre populações de espécies distintas e alcançar novos habitats antes impossíveis.

A similaridade genética encontrada para cpDNA nas populações de MG, SP e do litoral (RJ e ES) podem estar associadas a existência de populações introgridas que podem estar mediando a conectividade entre elas. A introgressão pode levar a muitos cenários instáveis em cruzamentos interespecíficos. As principais causas conhecidas da introgressão são que podem causar fusão de espécies distintas, submersão genética de uma espécie para outra, criar isolamento reprodutivo, que, muitas vezes, pode levar a especiação e transferência de material genético entre espécies (SEEHAUSEEN, 2004). Pinheiro et al. (2009) encontraram relações de conexão nas espécies de orquídeas *Epidendrum fulgens* (adaptada em áreas de dunas arenosas) e *E. puniceoluteum* (típica de áreas encharcadas), onde a ocorrência de plantas introgridas permitiu sua sobrevivência nos dois tipos de

habitats. Fraisse et al. (2014) também encontraram um padrão complexo de zonas de ocorrência de introgressão adaptativa entre espécies *Mytilus edulis* e *M. galloprovincialis* na costa ocidental da Europa e destacaram as modificações que podem ter sido causadas nos cenários biogeográficos para a evolução das espécies.

Neste estudo, ao considerar os valores das Tabelas 6 e 8, os níveis de diferenciação genética entre as duas espécies para cpDNA foram baixos e similares nos dois casos em que os híbridos estão como *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*. Entretanto, para ITS (Tabelas 7 e 9), a diferença entre as espécies é significativamente maior, sugerindo que as populações introgridas (Hib3 e Hib4) são mais próximas das populações da espécie *C. loddigesii*. Esse resultado é condizente com a comparação dos modelos testados para investigar a relação das populações introgridas com as espécies *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*, indicando maior aproximação de Hib3 e Hib4 com *C. loddigesii*. Como a semelhança genética para cpDNA das populações introgridas foi maior em relação à espécie *C. harrisoniana*, isto pode indicar que a origem da hibridação pode ter sido materna para *C. harrisoniana* e paterna para *C. loddigesii*. Devido à ocorrência geográfica das populações estar mais favorável à incidência de *C. loddigesii*, faz sentido que a polinização entre as populações introgridas e *C. loddigesii* esteja presente. Entretanto, van den Berg, (1996) observou que a população introgrida do município de Careacú-MG está reprodutivamente isolada das populações próximas de *C. loddigesii*. Esse isolamento pode ser fruto de uma depressão da aptidão ecológica dos indivíduos introgridos em relação aos seus parentais, onde esse tipo de situação pode levar a esse reforço no isolamento pré-zigótico da população (SEEHAUSEN, 2004).

Em relação às populações híbridas (Hib3 e Hib4) como sendo *C. loddigesii*, a AMOVA mostrou que não houve diferença nos valores de estruturação para ambas as regiões de DNA investigadas separadamente, sendo ambos considerados altamente estruturados. Esses valores concordam com Santos (2009), que encontrou valores similares para *C. loddigesii* ($G_{ST} = 0,283$). Entretanto, ao considerar os híbridos como sendo *C. harrisoniana*, a diferenciação entre as populações foi muito maior para ITS ($\Phi_{ST} = 0,702$) e maior também que o valor encontrado por Santos (2009) ($G_{ST} = 0,2154$). Isso indica que o fluxo gênico foi

altamente restrito entre as populações híbridas e as populações de *C. harrisoniana* do litoral para o marcador nuclear.

Nas análises de atribuição de indivíduos por inferência bayesiana para cpDNA, os dados foram discordantes dos resultados obtidos para a região ITS e combinados (Figuras 8A, 8B e 8C). Para cpDNA, apesar da ampla distribuição, os híbridos (Hib3 e Hib4), as populações mais ao Norte do Estado de SP e as populações de MG se agruparam com as populações de *C. harrisoniana*, enquanto que as populações da região Sul de SP formaram outro grupo, concordando parcialmente com os resultados de van den Berg (1996) e Santos; van den Berg (2009) (Figura 2), onde os híbridos foram geneticamente mais próximos de *C. harrisoniana*. Entretanto, para dados nucleares e combinados (cpDNA + ITS), as populações híbridas foram mais próximas de *C. loddigesii*, principalmente das populações do Estado de MG e das populações mais ao Sul do Estado de SP, enquanto que as populações da região norte de SP se mostraram próximas das populações de *C. harrisoniana* do litoral, formando um corredor entre o primeiro agrupamento de ITS que liga as populações do litoral às populações da região mais oeste de SP. Esses dados condizem com o levantamento de espécies nessas regiões, onde é possível encontrar registros de indivíduos de *C. harrisoniana* nessa região (VAN DEN BERG², informação verbal; FERREIRA et al., 2010).

Pode-se sugerir, portanto, a ocorrência de populações simpátricas das duas espécies, como já descrito por van den Berg e Martins (1998). Além disso, os dados para a análise de atribuição de indivíduos somados com o nível de estruturação em algumas populações suporta a hipótese de que existe maior número de populações híbridas. Contudo, uma investigação mais acurada torna-se necessário para confirmar se essas populações são realmente híbridas.

6.4 Estruturação das populações

Ao comparar a estrutura genética das populações desse estudo com outros estudos similares de orquídeas é possível notar que o valor de Φ_{ST} para ITS foi considerado alto em relação às outras espécies para regiões nucleares e mais baixos para cpDNA (PINHEIRO et al., 2014; RODRIGUES, 2015). Apesar dessa diferença, os valores obtidos para cpDNA e ITS foram condizentes com o estudo de

² van den Berg, C. Universidade Estadual de Feia de Santana.

Santos (2009) que, ao investigar a estruturação genética de populações de *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana* por marcadores ISSR, obteve os valores de diferenciação (G_{ST}) igual a 0,3062 para as populações das duas espécies em conjunto. Ao comparar a estruturação genética para cada espécie separadamente, os valores de Φ_{ST} foram maiores para ITS do que para cpDNA, sendo portanto discordantes. Como esperado, a variação encontrada em ambas as espécies indica que o mecanismo de reprodução é do tipo alogâmico, onde a variabilidade dentro das populações é maior do que entre elas (HAMRICK et al., 1991), corroborando os resultados de Stort e Martins (1980) para as espécies *C. loddigesii* e *C. harrisoniana*. Entretanto, o resultado obtido para ITS, ao agrupar as populações de *C. harrisoniana* do litoral com os híbridos, apresentou maior estruturação entre as populações. Isso pode ter ocorrido devido à maior diferenciação dos híbridos às populações de *C. harrisoniana* puras (H1 e H2) e mais próximas de populações de *C. loddigesii*, como discutido anteriormente. Além disso, o número de indivíduos utilizado pode ter influenciado a maior similaridade com *C. loddigesii*, uma vez que para *C. harrisoniana* apenas duas populações puras foram amostradas.

A história das populações das espécies desse estudo é amplamente complexa uma vez que as populações apresentam identidades genéticas amplamente distribuídas, resultando no alto grau de compartilhamento dos haplótipos, principalmente em regiões plastidiais. Isso pode indicar ampla dispersão das sementes, tanto no litoral, quanto no interior dos Estados de MG e SP, mostrando maior eficiência, neste caso. As análises de estruturação e a proporção do pólen *versus* semente corroboram essa hipótese, uma vez que apresentaram maior homogeneidade para cpDNA e ligeira eficiência de fluxo gênico por sementes. No entanto, a maior eficiência da dispersão por sementes é proporcional à distância entre as populações, por isso, uma abordagem mais densa talvez mudasse a eficiência para pólen.

A comparação dos modelos por Bayes Factor a partir de dados combinados para inferir a estruturação das populações indicou que há ocorrência de populações estruturadas e que elas seguem o modelo de isolamento por distância. O isolamento por distância é caracterizado pelo fluxo gênico local entre vizinhos em populações de distribuição contínua (WRIGHT, 1969). Esses dados concordam com as análises de distribuição de haplótipos, bem como NCPA, onde foi observada grande

diferenciação nas populações do litoral em relação às populações do interior e compartilhamento de haplótipos em populações geograficamente mais próximas. Segundo Kageyama (1986), os fatores que influenciam o fluxo gênico entre as populações e estruturação entre elas são os meios de dispersão por pólen e sementes. Se existem barreiras entre as populações, seja genética, geográfica, química, etc. haverá maior diferenciação entre elas.

A amplitude geográfica haplotípica é coerente com os estudos de Arditti e Ghani (2000), onde estudaram as sementes das orquídeas, e observaram que constituem tamanhos reduzidos e, conseqüentemente fáceis de dispersar pelo vento, podendo alcançar longas distâncias. Por outro lado, apesar da ampla distribuição também encontrada em alguns haplótipos de dados nucleares, estes se mostraram mais estruturados e limitados para outros haplótipos detectados, o que pode estar relacionado com o alcance dos polinizadores ou com a falta de amostragem. Além disso, o isolamento por distância, neste caso, pode estar também associado com uma barreira mediada pelo isolamento reprodutivo entre as populações de espécies distintas, principalmente pela diferenciação entre populações do interior e litoral.

Um estudo elaborado por Janzen (1971) encontrou relação de abelhas do gênero *Bombus* compatíveis com viagens a longas distâncias, podendo alcançar mais de 20 quilômetros em áreas de floresta tropical. Portanto, a atuação de polinizadores, juntamente com a ampla dispersão de sementes, explicam os resultados obtidos para os marcadores ITS, já que são biparentais e levam em consideração as duas hipóteses como possíveis fatores de dispersão (Figura 10).

Um padrão de maior eficiência através do fluxo gênico de pólen é encontrado entre as populações de *C. harrisoniana* do litoral. Apesar de ligeira proporção em relação às sementes, esse é coerente com a distância geográfica entre elas, uma vez que os polinizadores são aptos a viajar a longas distâncias (JANZEN, 1971), porém podem ser mais limitadas que a dispersão de sementes. Pinheiro et al. (2011) e Kartzinel et al. (2013) encontraram índices muito maiores de proporção do fluxo gênico via pólen do que os encontrados nesse estudo. Apesar disso, os resultados são consistentes com os esperados em espécies de orquídeas, onde se espera que a proporção do fluxo gênico via pólen seja baixa devido às limitações geográficas comparadas às longas distâncias que as sementes podem atingir (ARDITTI; GHANI, 2000; TREMBLAY et al., 2005).

Os altos índices de estruturação encontrados em algumas populações podem ser devido ao fato de que a deriva juntamente com a seleção atuaram para isso acontecer, onde a deriva genética pode resultar em grande diferenciação em populações recentemente colonizadas ou com ausência de conexão, o que leva a se diferenciarem com o tempo (TREMBLAY et al., 2005; RIDLEY, 2006; WATERMAN; BIDARTONDO, 2008; GIVNISH, 2010). Além disso, para dados de cpDNA, quando a população está sob efeito da deriva, a fixação dos alelos pode ocorrer muito mais rápido devido à característica uniparental que essa região apresenta (HEDRICK, 2011). Outro motivo pelo qual a estruturação pode ter sido alta em algumas populações de *C. loddigesii* deve-se provavelmente por conta da descontinuidade na floração e porque a análise considerou todas as populações de *C. loddigesii* em conjunto, o que contribuiu para o aumento da estruturação mediada por todas. Nas análises de estruturação par a par obtida pela AMOVA (APÊNDICE B) é possível observar que algumas populações possuem baixos valores de estruturação genética em *C. loddigesii* e proximidade com populações de longas distâncias geográficas, como entre Alambari-SP e Tiradentes-MG. Entretanto, neste caso, a proximidade das populações em relação à amplitude geográfica pode estar mais relacionada com a conectividade entre zonas de introgressão e as populações periféricas estudadas, uma vez que isso também é capaz de permitir trocas gênicas nas populações, mesmo com a presença de isolamento reprodutivo devido às características intermediárias das populações introgrididas (SEEHAUSEN, 2004).

Mesmo com o alto nível de relação genética entre populações, algumas delas, tais como Iracemápolis-SP, apresentaram altos níveis de diferenciação com a maioria das populações, apesar de estarem muito próximas geograficamente de Piracicaba, por exemplo. Essa grande estruturação pode estar relacionada com o efeito da deriva, responsável por desencadear uma diferenciação nas populações devido ao aumento de divergência entre elas e rápida fixação de alelos (HARTL, 2010). Além disso, o fato de que elas estão dispersando suas características gênicas para outras populações sugere que pode ter ocorrido um gargalo seguido por expansão populacional e, assim, as populações conseguiram se perpetuar. Na população de Iracemápolis-SP, por exemplo, é possível observar esse padrão, uma vez que esta pode ter se dispersado para as populações geograficamente próximas, tais como Piracicaba, Santa Maria da Serra, subindo para o Sul de Minas em Ouro

Fino e chegando até São José dos Campos-SP. O tempo de divergência datado para os dados haplotípicos dessa população corrobora a hipótese da rápida expansão pelo fato de que sua divergência foi recente e apresentou diversidade genética considerável. As características dos indivíduos dessa população são tipicamente de *C. loddigesii*, onde são morfologicamente consistentes com os dados de populações estudadas por van den Berg (1996).

Outra população com características interessantes é a do município de Porangaba-SP, que também apresentou grau de isolamento para a região plastidial. As características morfológicas dessa população (ANEXO A) parecem ser semelhantes às populações de Carlópolis-PR estudada por van den Berg (1996), o que é esperado, uma vez que possuem proximidades geográficas. Van den Berg (1996) considerou a morfometria da população de Carlópolis-PR e Laranjal Paulista-SP diferenciadas das demais populações caracterizando-as como populações mais ao Sul da amostragem. Similarmente, é possível observar essa proximidade de Porangaba-SP com essas populações uma vez que são geograficamente próximas e morfologicamente semelhantes, entretanto são necessários estudos da morfologia dessas plantas para confirmar esse padrão. Além disso, os resultados de estruturação são consistentes com os resultados de van den Berg (1996), onde observou diferenciação morfométrica nessas populações do Sul de SP das demais populações.

Para adquirir dados consistentes na inferência de padrões filogeográficos, é necessário uma boa amostragem considerando a amplitude da distribuição geográfica das espécies. O amplo compartilhamento dos haplótipos em cpDNA para as populações largamente distribuídas podem indicar baixa divergência genética e podem ter sido provenientes de populações ligadas no passado e que deram origem a populações com linhagens limitadas a certas localizações (CARVALHO; ALMEIDA, 2013).

6.5 Reconstrução filogeográfica

A filogeografia das populações das espécies *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* apresenta um padrão consistente com os resultados das análises de estruturação e migrações das populações. O padrão filogeográfico observado mostra uma descontinuidade de populações do extremo Sul de SP, sugerindo possível barreira entre elas e, conseqüentemente, o surgimento de populações diferenciadas. Essa

descontinuidade pode estar associada com um evento glacial, tectônica de placas ou outro evento que desencadeou uma barreira gênica ou ainda, maior diferenciação devido ao isolamento por distância. Amaro et al. (2012) e Batalha-Filho et al. (2012) encontraram algo similar ao estudar populações de anuros e pássaros, respectivamente. Van den Berg e Martins (1998) observaram que populações do extremo Sul do Estado de SP apresentaram diferenciação morfológica marcante comparada às outras populações das duas espécies. Algo similar também foi encontrado em Porangaba-SP para uma população de *C. loddigesii*. Além disso, van den Berg e Martins (1998) sugeriram uma possível zona de refúgio situada no extremo Sul de SP. A diversificação e presença de haplótipos exclusivos nas populações de Porangaba-SP e Alambari-SP, podem ser indícios de que a região pode ter sido um centro de diversificação como consequência de uma zona de refúgio.

As populações mais ao Norte do Estado de SP foram estruturalmente distintas das populações localizadas mais ao Sul. Além disso, os altos índices de diversidade genética encontrados no extremo sul de SP sugerem que ali pode ter havido um centro de diversidade, caracterizando uma possível zona de refúgio, inferida por van den Berg (1996) e Amaro et al. (2012). Outra possível fonte de diversidade sugerida são as populações mais ao norte da amostragem, caracterizadas pelas populações do Sul de MG. As análises de datação sugerem que essas populações são antigas o suficiente para essa região ser considerada um outro centro de diversidade. Ademais, estudos anteriores em espécies de orquídeas também sugerem que em MG existe uma zona de espécies ancestrais próximo à Serra do Espinhaço (ANTONELLI, 2010; RODRIGUES, 2015).

De cerca de 300 mil anos atrás a 150 mil anos e após 100 mil anos até o presente, há relatos de possíveis eventos glaciais que atingiram a América e que, consequentemente, algumas espécies sofreram com a refrigeração e contração das florestas (BEHLING, 2002). Para as espécies desse estudo esse padrão não parece ter ocorrido em algumas regiões amostradas. Entretanto, é possível observar um padrão de eventos migratórios em direção Norte-Sul durante esse período, corroborado por Rodrigues (2015). Além disso, houve uma grande expansão das populações do Estado de SP e, consequentemente, os indivíduos migrantes de MG e SP se encontraram e inter cruzaram no corredor longitudinal do extremo Sul de MG

e Norte de SP, caracterizando uma zona de hibridação e introgressão. Amaro et al. (2012), investigando processos demográficos da espécie de sapo *Proceratophrys boiei*, identificaram uma possível zona de hibridação em SP, semelhante ao corredor de populações simpátricas encontrado nesse estudo.

Os resultados de NCPA sugerem que alguns eventos de dispersão podem ter ocorrido por populações intermediárias que foram extintas ou não amostradas. Isso indica que apesar da estruturação das populações do litoral em relação às de MG, pode ser que existiram populações de regiões próximas de Muqui-ES e Cordovil-RJ que tenham compartilhado características genéticas com populações de MG. Além disso, podem ter havido haplótipos existentes que conectaram essas populações no passado que não foram amostrados neste estudo. A chave de inferência para os resultados das análises NCPA indicou que houveram alguns eventos de expansão contíguos em alguns clados de ambas as regiões, entretanto, os valores de F_u , apesar de ter sido negativo, indicando expansão, não foi significativo. O valor não significativo encontrado, neste caso, pode estar relacionado com a expansão contígua encontrada. Se a expansão fosse contínua, talvez as análises de F_u e também a análise D de Tajima detectassem essas expansões. Apesar disso, os gráficos Skyline mostram que houve expansão das populações a partir de 100 mil anos até o presente, indicando que a expansão pode ter ocorrido no final de um período glacial e no período interglacial. Esses resultados também concordam com a árvore de estimativa de tempo de divergência, que sugere que um maior número de haplótipos dataram ser entre 200 e 100 mil anos até o presente. Além disso, o alto número de tamanho efetivo populacional encontrado para ambas as regiões corrobora a hipótese de expansão populacional.

Outro fator importante na disseminação das espécies é considerar os vales onde correm os efluentes. Ao assumir que as populações são muito bem dispersas por sementes e levadas através do vento (ARDITTI, 1967), pode-se dizer que o Rio Paraná pode ter sido um meio de dispersão de sementes de *C. loddigesii* para chegar em outros países, como há registros na Argentina e Paraguai (BARBOSA RODRIGUES, 1996) devido às correntes de vento que formam nos vales dos rios. A disseminação a partir de São José dos Campos-SP para o litoral também é coerente ao considerar que o Vale do Paraíba desagua no oceano entre as populações de Cordovil e Muqui-ES. Além disso, segundo a teoria de Fowlie (1977), a biogeografia das *Cattleyas* bifoliadas indica que o Vale do Paraíba pode ter sido

um dos locais de origem de dispersão de espécies. Considerando que a população de São José dos Campos-SP é uma população situada na cabeceira do Vale, pode-se dizer que a partir dela, as populações de *C. harrisoniana* se dispersaram para o litoral. Antonelli et al. (2010) encontraram um padrão similar ao observar que a difusão das espécies do gênero *Hoffmannseggella* foi no sentido interior para litoral. As análises de NCPA também concordam com essa hipótese uma vez que sugerem que a espécie *C. loddigesii* é mais ancestral e que *C. harrisoniana* pode ter divergido de populações de *C. loddigesii* através da migração para o litoral. Além disso, a difusão de populações de *C. loddigesii* parecem ter se dispersado do sul para o norte há cerca de 500 mil anos e, posteriormente, voltaram para o Estado de SP.

Rodrigues (2015) observou um padrão similar ao analisar a filogeografia de populações de espécies do complexo *C. coccinea*, onde as espécies pareciam se dispersar em direção Norte-Sul. A conquista de novos habitats, considerado um fator de estresse, pode modificar o padrão fisiológico e biológico dos seres vivos, podendo ter sido responsável por modificar os genes da fenologia da espécie de *C. harrisoniana*, ocasionando o isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, sofrido um processo de especiação (BÜHLER; SCHMID, 2001). Entretanto, isso tem que ser visto com cautela, uma vez que resultados oriundos de amostragem híbrida ou introgridida podem afetar a topologia das árvores, por exemplo, tornando-o mais ancestral e causando incongruências em estudos com regiões de DNA distintas (ALVAREZ; WENDEL, 2003; SEEHAUSEN, 2004).

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, foi possível concluir que:

- Os resultados suportam a hipótese de que *C. loddigesii* e *C. harrisoniana* são espécies distintas e que as populações introgridas de São José dos Campos-SP e Careacú-MG não formam uma terceira espécie.
- As populações introgridas de São José dos Campos-SP e Careacú-MG possuem graus de parentescos maior com *C. loddigesii* do que com *C. harrisoniana*.
- Há evidências de mais populações híbridas entre as espécies.
- Homogeneidade entre as populações foi detectada, provavelmente mantida devido à conectividade entre elas, pelas populações introgridas, dispersão de sementes a longas distâncias pelo vento e polinização por abelhas de longo alcance.
- Entre as populações analisadas é possível determinar que algumas delas encontram-se divididas e estruturadas.
- A estruturação encontrada, pode ter sido influenciada pela distância entre elas, uma vez que se isolaram devido ao fluxo local de pólen em certas áreas e diferenças climáticas entre litoral e interior.
- As populações do Estado de São Paulo, primeiramente, se dispersaram em direção ao Norte (Estado de Minas Gerais). Posteriormente, as populações do Norte se dispersaram para o Sul novamente.
- As populações das duas espécies evidenciaram eventos de expansão. Entretanto, para *C. harrisoniana* o índice de expansão foi menor. O índice de expansão detectado foi condizente com o período glacial e período interglacial datados há 100 mil anos desde o presente, indicando que não houve interferência dessas populações nesses períodos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P.R.M.; LOPEZ-ROBERTS, M.C.; VIGNA, B.B.Z.; SOUZA, A.P.; GOES-NETO, A.T.; VAN DEN BERG, C. Microsatellite markers for the endangered orchids *Cattleya labiata* Lindl. and *C. warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 791-794, 2013.
- ALVAREZ, I.; WENDEL, J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 29, n. 3, p. 417-434, 2003.
- 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.; SANMARTÍN, I. Why are there so many plant species in the Neotropics? **Taxon**, Bratislava, v. 60, n. 2, p. 403–414, 2011.
- 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. Affecting the germination of orchid seeds. **Botanical Review**, New York, v. 33, n. 1, p. 1-97, 1967.
- ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **The New Phytologist**, Lancaster, v. 145, n. 3, p. 367-421, 2000.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Cambridge Harvard University Press, 2000. 447 p.
- AVISE, J.; ARNOLD, J.; BALL, R.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.; REEB, C.; SAUNDERS, N. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489–522, 1987.
- BARBOSA RODRIGUES, J. **Iconographie des orchidées du Brésil**. Basel: Friedrich Reinhardt Verlag, 1996. v. 1, 540 p.
- BATALHA-FILHO, H.; CABANNE, G.S.; MIYAKI, C.Y. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 65, p. 892–902, 2012.
- BECERRA, V.; PAREDES, M. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares em estudos de diversidade genética. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 60, n. 3, p. 270-281, 2000.

BEERLI, P. Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 827-836, 2004.

_____. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. **Bioinformatics**, Oxford, v. 22, p. 341–345, 2006.

_____. How to use migrate or why are Markov Chain Monte Carlo programs difficult to use? In: BERTORELLE, G.; BRUFFORD, M.W.; HAUFFE, H.C.; RIZZOLI, A.; VERNEZI, C. **Population genetics for animal conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. p. 42-79. (Conservation Biology, 17). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511626920.004>>. Acesso em: 13 maio 2016.

BEERLI, P.; PALCZEWSKI, M. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. **Genetics**, Bethesda, v. 185, p. 313–326, 2010.

BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, Amsterdam, v. 177, p. 19–27, 2002.

BELL, K.L.; RANGAN, H.; KULL, C.A.; MURPHY, D.J. The history of introduction of the African baobab (*Adansonia digitata*, Malvaceae: Bombacoideae) in the Indian subcontinent. **Royal Society Open Science**, Glasgow, v. 2, n. 9, p. 1-15, 2015.

BENNETT, K.D.; TZEDAKIS, P.C.; WILLIS, K.J. Quaternary refugia of north European trees. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 18, p. 103–115, 1991.

BIELEJEC, F.; RAMBAUT, A.; SUCHARD, M.A.; LEMEY, P. SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 20, p. 2910-2912, 2011.

BIERNE, N.; WELCH, J.; LOIRE, E.; BONHOMME, F.; DAVID, P. The coupling hypothesis: why genome scans may fail to map local adaptation genes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 2044–2072, 2011.

BRAEM, G.J. **Die bifoliaten Cattleyen Brasiliens**. Hildesheim: Alemanha:Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 1984. 94 p.

BRANDÃO, M.M. **Diversidade genética e filogeografia de *Ceiba pubiflora* (a.st. - hil.) k. schum. (Malvaceae)**. 2012. 115 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos em Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas) Universidade Federal de Lavras, Minas gerais, Lavras, 2012.

BRIEGER, F.G.; MAATSCH, R.; SENGHAS, K. (Ed.). **Schlechter's Die Orchideen**. Berlin: Paul Parey, 1981. 714 p.

BUSH, M.B.; OLIVEIRA, P.E. Apogeu e declínio da hipótese dos refúgios para a especiação na Amazônia: uma perspectiva paleoecológica. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2006.

BUZATTO, C.R.; FERREIRA, P.P.A.; WELKER, C.A.D.; SEGER, G.D.S.; HERTZOG, A.; SINGER, R.B. Brazilian Journal of Biosciences. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae: Laeliinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista brasileira Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 388-398, 2010.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. cap. 1, p. 9-78.

CARDOSO, D.C.; CRISTIANO, M.P.; TAVARES, M.G.; SCHUBART, C.D.; HEINZE, J. Phylogeography of the sand dune ant *Mycetophylax simplex* along the Brazilian Atlantic Forest coast: remarkably low mtDNA diversity and shallow population structure. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 15, n. 106, p. 1-13, 2015.

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.

CARVALHO, C.J.B.; ALMEIDA, E.A.B. **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos**. São Paulo: Ed. Roca, 2013. 320 p.

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.

COLOMBI, V.H.; LOPES, S.R.; FAGUNDES, V. Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent: short communication. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 4, p. 785-789, 2010.

CORONADO, E.N.H.; DEXTER, K.G.; POELCHAU, M.F.; HOLLINGSWORTH, P.M.; PHILIPS, O.L.; PENNINGTON, R.T. *Ficus insipida* subsp. *insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread Neotropical rain forest tree species. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 41, p. 1697-1709, 2014.

COZZOLINO, S.; NOCE, M.E.; MUSACCHIO, A.; WIDMER, A. Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 90, p. 1681–1687, 2003.

CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. **Genetics**, Bethesda, v. 134, p. 959-969, 1993.

DAVEY, J.; BLAXTER, M.L. RADSeq: next-generation population genetics. **Briefings in Functional Genomics**, Oxford, v. 9, n. 5/6, p. 416-423, 2010.

DOMINGUES, V.S.; POH, Y.P.; PETERSON, B.K.; PENNINGS, P.S.; JENSEN, J.D.; HOEKSTRA, H.E. Evidence of adaptation from ancestral variation in young populations of beach mice. **Evolution**, Oxford, v. 66, n. 10, p. 3209–3223, 2012.

DOUZERY, E.J.P.; PRIDGEON, A.M.; KORES, P.; LINDER, H.P.; KURZWEIL, H.; CHASE, M.W. Molecular phylogenetics of *Diseae* (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. **American Journal Botany**, St. Louis, v. 86, n. 6, p. 887-899, 1999.

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**, London, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 314 p.

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.

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.

EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Resources**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EDWARDS, S.V.; BEERLI, P. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. **Evolution**, Oxford, v. 54, p. 1839-1854, 2000.

ELSHIRE, R.J.; GLAUBITZ, J.C.; SUN, Q.; POLÔNIA, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E.S.; MITCHELL, S.E. A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e19379, 2011.

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.

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. 564–567, 2010.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, Oxford, v. 1, p. 47–50, 2005.

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. 18, p. 479–491, 1992.

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.

FEHRER, J.; GEMEINHOLZER, B.; CHRTEK, J.; BRÄUTIGAM, S. Incongruent plastid and nuclear DNA phylogenies reveal ancient intergeneric hybridization in *Pilosella hawkweeds* (Hieracium, Chichorieae, Asteraceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 42, p. 374–361, 2007.

FELINER, G.N.; ROSSELLÓ, J.A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of ITS, ITS in species-level evolutionary studies in plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 44, p. 911-919, 2007.

FERREIRA, A.W.C.; LIMA, M.I.S.; PANSARIN, E.M. Orchidaceae na região central do Estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 2, p. 243-259, 2010.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996. 220 p.

FORZZA, R.C.; LEITMAN, P.M.; COSTA, A.; CARVALHO, A.A.; PEIXOTO, A.L.; WALTER, B.M.T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D.P.; LIERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H.C.; PRADO, J.; STEHMANN, J.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; PIRANI, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; MAIA, L.C.; LOHMANN, L.G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M.C.H.; BASTOS, M.A.C.; MORIM, M.P.; BARBOSA, M.R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V.C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 1. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/vol1.pdf>> Acesso em: 13 nov. 2014.

_____. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

v. 2. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/vol2.pdf>> Acesso em: 13 nov. 2014.

_____. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, Uberlândia, v. 62, n. 1, p. 39–45, 2012. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/FUNG1.pdf>> Acesso em: 13 dez. 2015.

FOWLIE, J.A. **The Brazilian bifoliate *Cattleyas* and their color varieties**. Azul Quinta Press, Pomona, California, 1977. 132 p.

FRAÏSSE, C.; ROUX, C.; WELCH, J.J.; BIERNE, N. Gene-flow in a mosaic hybrid zone: is local introgression adaptive? **Genetics**, Bethesda, v. 197, p. 939–951, 2014.

FRANKHAM, R.; BALLOW, J. D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos da genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 259 p.

GAGNAIRE, P.A.; PAVEY, S.A.; NORMANDEAU, E.; BERNATCHEZ, L. The genetic architecture of reproductive isolation during speciation-with-gene-flow in lake white fish species pairs assessed by RAD sequencing. **Evolution**, Oxford, v. 67, n. 9, p. 2483–2497, 2013.

GARRICK, R.C.; BONATELLI, A.S.; HYSENI, C.; MORALES, A.; PELLETIER, T.A.; PEREZ, M.F.; RICE, E.; SATLER, J.D.; SYMULA, R.E.; THOMÉ, M.T.C.; CARSTENS, B.C. The evolution of phylogeographic data sets. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 24, p. 1164–1171, 2015.

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

GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 998–1006, 1994.

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

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. **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 75–86.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

HAWKES, A.D. **Encyclopaedia of cultivated orchids**. London: Faber and Faber: 1965. 602 p.

HEWITT, G.M. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 537–549, 2001.

_____. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, San Francisco, v. 359, p. 183–195, 2004.

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

HOEHNE, F.C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Gráfica F. Lanza, 1949. 601 p.

JANZEN, D.H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, New York, v. 171, p. 203-205, 1971.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação “in situ” de recursos genéticos de plantas. **Silvicultura**, São Paulo, v.11, n.41, p.7-37, 1986.

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.

KNOWLES, L.L. Statistical phylogeography. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 40, p. 593-612, 2009.

KUHNER, M.K. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 24, p. 86-93, 2009.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 36–42, 2005.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p. 1541-1542, 2009.

LIMA, N.E. **Filogeografia de populações naturais do buriti (*Mauritia flexuosa* L. f., arecaceae) do Brasil central**. 2012. 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

LINDLEY, J. **Collectanea botanica**: figures and botanical illustrations of rare and curious exotic plants. London: Richard and Arthur Taylor, 1821. 108 p.

LONGO, D.; LORENZ-LEMKE, A.; MADER, G.; BONATTO, S.; FREITAS, L. Phylogeography of the *Petunia integrifolia* complex in southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 174, p. 199-213, 2014.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65–95, 1984.

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

MARKOLF, M.; KAPPELER, P.M. Phylogeographic analysis of the true lemurs (genus *Eulemur*) underlines the role of river catchments for the evolution of micro-endemism in Madagascar. **Frontiers in Zoology**, Munich, v. 10, p. 70, 2013.

MARTIN, D.P.; MURRELL, B.; GOLDEN, M.; KHOOSAL, A.; MUHIRE, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2015.

MATOS, M.V.; BORGES, S.H.; D'HORTA, F.M.; CORNELIUS, C.; LATRUBESSE, E.; COHN-HAFT, M.; RIBAS, C.C. Comparative phylogeography of two bird species, *Tachyphonus phoenicius* (Thraupidae) and *Polytmus theresiae* (Trochilidae), specialized in Amazonian white-sand vegetation. **Biotropica**, New Jersey, v. 48, p. 110-120, 2016.

MCCAULEY, D.E. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 10, n. 5, p. 198- 202, 1995.

MINDER, A. **How porous are plant genomes? Introgressive hybridization in a *Silene* (Caryophyllaceae) species pair**. 2007. 101 p. Thesis (PhD in Sciences) - University of Zurich, Zurich, 2007.

MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R.; HOFFMAN, M.; PILGRIM, J. BROOKS, T.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOREUX, J.; FONSECA, G.A.B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Sierra Madre: CEMEX & Agrupación 2004. 392 p.

MONTEIRO, S.H.N. **Revisão taxonômica e filogenia do gênero *Galeandra* Lindl. (Orchidaceae: Catasetinae)**. 2007. 178 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Departamento de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

MORAIRA, S.H. **Comparative phylogeography of chloroplast and nuclear DNA markers reveals ancient and present hybridization in the Mediterranean *Helichrysum pendulum* complex (Compositae)**. 2014. 33 p. Dissertation (Master's Degree in Terrestrial Ecology and Biodiversity Management Terrestrial Ecology) - Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2014.

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

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain restriction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 55, p. 335-350, 1987.

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.

NEUBIG, K.M.; WHITTEN, W.M.; CARLSWARD, B.S.; BLANCO, M.A.; ENDARA, L.; WILLIAMS, N.H.; MOORE, M. Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids: a plastid gene more variable than *matK*. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 277, p. 75-84, 2009.

NEWTON, A.C.; ALLNUTT, T.R.; GILLIES, A.C.M.; LOWE, A.J.; ENNOS, R.A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 14, n. 4, p. 140-145, 1999.

NOVAES, R.M.L.; LEMOS, J.P.; RIBEIRO, R.A.; LOVATO, M.B. Phylogeography of *Plathymeria reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 985-998, 2010.

_____. Concordance between phylogeographical and biogeographical Patterns in the Brazilian Cerrado: diversification of the endemic tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-13, 2013.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasiliensis**. Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, 1975. v. 1, 408 p.

PAITHANKAR, K.; PRASAD, K. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 6, p. 1346, 1991.

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.

PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARÁ, T.; FAY, M.F.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 3185-3201, 2011.

PANSARIN, E.R.; PANSARIN, L.M. **The family Orchidaceae in the Serra do Japi**, Vienna: Springer, 2011. 287 p.

PEREIRA, F.; MOREIRA, C.; FONSECA, L.; ASCH, B.; MOTA, M.; ABRANTES, I.; AMORIM, A. New insights into the phylogeny and worldwide dispersion of two closely related nematode species, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-11, 2013.

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. **Estrutura genética de zonas de hibridação natural entre *Epidendrum fulgens* e *E. puniceoluteum* (Orchidaceae)**. 2009. 101 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Botânica – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; FAY, M.; 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.
- PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; BARROS, F.; GOUVEIA, T.; SUZUKI, R.; FAY, M.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. **Evolution**, Oxford, v. 67, n. 7, p. 2024–2039, 2013.
- PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; DRAPER, D.; BARROS, F.; FÉLIZ, L.; FAY, M.; PALMA-SILVA, C. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 49, p. 1–15, 2014.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; MEYER, D.; FAY, M.F.; SUZUKI, R.M.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 981–994, 2010.
- PINHEIRO, L.R.; RABBANI, A.R.C.; DA SILVA, A.V.C.; LÉDO, A.S.; PEREIRA, K.L.G.; DINIZ, L.E.C. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 298, p. 1815–1825, 2012.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 487–488, 2000.
- PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W. RASMUSSEN, F.N. (Ed.). **Genera Orchidacearum: Epindroideae (Part one)**. Oxford: Oxford University Press, 2005. v. 4, 672 p.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Bethesda, v. 155, p. 945–959, 2000.
- PROVAN, J.; BENNETT, K.D. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 23, p. 564–571, 2008.
- PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 16, p. 142–147, 2001.

QGIS DEVELOPMENT TEAM. **QGIS Geographic Information System**: Open Source Geospatial Foundation Project. Disponível em: <<http://qgis.osgeo.org>> Acesso em: 10 mar. 2016.

RAMBAUT, A. **FigTree v.1.4.2**: tree figure drawing tool. 2012. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M.; DRUMMOND, A. **Tracer**: version 1.6. 2013. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

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.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 752 p.

RODRIGUES, J.F. **Relações filogenéticas e filogeográficas das espécies do complexo *Cattleya coccinea* (Orchidaceae)**. 2015. 141 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

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.

RUIZ-GARCÍA, M.; VÁSQUEZ, C.; SANDOVAL, S.; KASTON, F.; LUENGAS-VILAMIL, K.; SHOSTELL, J. M. Phylogeography and spatial structure of the lowland tapir (*Tapirus terrestris*, Perissodactyla: Tapiridae) in South America. **Mitochondrial DNA. The Journal of DNA Mapping Sequencing, and Analysis**, New York, v. 27, n. 4, p. 2334-2342, 2015.

SAMARAKOON, T.; WANG, S.Y.; ALFORD, M. Enhancing PCR Amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive application in plant sciences. **Botanical Society of America**, London, v. 1, n. 1, p. 795-804, 2013.

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. 66 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana – Feira de Santana, 2011.

SANTOS, T.M.; ALMEIDA, P.R.M.; VAN DEN BERG, C. Variabilidade genética em populações do complexo *cattleya loddigesii* lindl. e *cattleya harrisoniana* bateman ex lindl. (Orchidaceae) através de marcadores moleculares de ISSR. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 60. 2009, Feira de Santana. Disponível em: <http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/60CNBot/ResumoSimples2009_914.pdf>. Acesso em: 06 out 2014.

SCOTTI-SAINTAGNE, C.; DICK, C.W.; CARON, H.; VENDRAMIN, G.G.; GUICHOUX, E.; BUONAMICI, A.; DURET, C.; SIRE, P.; VALENCIA, R.; LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; SCOTTI, I. Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa* , Meliaceae). **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 676-692, 2013.

SEEHAUSEN, O. Hybridization and adaptive radiation. **Trends Ecology Evolution**, London, v. 19, n. 4, p. 198-207, 2004.

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

SHAW, J.; SHAFER, H.L.; LEONARD, O.R.; KOVACH, M.J.; SCHORR, M.; MORRIS, A.B. Chloroplast dna sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in angiosperms: the tortoise and the hare IV. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 101, n. 11, p. 1987-2004, 2014.

SHAW, J.; LICKY, E.; BECK, J.; FARMER, S.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K.; WINDER, C.; SCHILLING, E.; SMALL, R. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 92, p. 142–166, 2005.

SMIDT, C.E. **Filogenia e revisão taxonômica de *Bulbophyllum thouars* (Orchidaceae) ocorrente no Neotrópico**. 2007. 346 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Departamento de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2007.

SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V.; BORBA, E.L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to North-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, Massachusetts, v. 21, p. 85-91, 2006.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular systematics of plants**. Boston; Dordrecht, London: Kluwer Academic, 1998. v. 2, p. 1-42

STADEN, R.; BEAL, K.F.; BONFIEL, J.K. The Staden package. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 132, p. 115-130, 1998.

STORT, M.N.S.; MARTINS, P.S. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). **Ciencia y Cultura**, San Pablo, v. 32, p. 1080–1083, 1980.

SWENSON, N.G.; HOWARD, D.J. Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. **The American Naturalist**, Chicago, v. 166, p. 581–591, 2005.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 28, p. 2731–2739, 2013.

TANAKA, R.H.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives III**. Ithaca: Cornell University Press, 1984. p. 324-410.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G.A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, Oxford, v. 322, p. 652–656, 1986.

TEMPLETON, A. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 381–397, 1998.

TEMPLETON, A.R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 779–791, 2001.

_____. **Population genetics and microevolutionary theory**. St. Louis: John Wiley Wiley-Liss, 2006. 716 p.

TEMPLETON, A.; SING, C. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping .4. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. **Genetics**, Bethesda, v. 134, p. 659–669, 1993.

TEMPLETON, A.R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, Bethesda, v. 140, p. 767–782, 1995.

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.

THOMÉ, M.T.C.; ZAMUDIO, K.R.; HADDAD, C.F.B.; ALEXANDRINO, J. Barriers, rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, p. 6152–6164, 2014.

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.

TSAI, Y.H.E. PhyloGeoViz: a web-based program that visualizes genetic data on maps. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, p. 557–561, 2011. Disponível em: <<http://phylogeoviz.org/>>. Acesso em: 09 maio 2016.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; CRUZ, F.; VENDRAMIN, G.G.; SIMON, M.F.; SALGUEIRO, F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 65, n. 1, p. 174-182, 2012.

VALDEZ, L.; D'ELÍA, G. Differentiation in the Atlantic Forest: phylogeography of *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae) and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia. **Journal of Mammalogy**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 911–922, 2013.

VAN DEN BERG, C. **Estudo da variabilidade intra e interespecífica em populações de espécies brasileiras de *Cattleya* (Orchidaceae-Laeliinae)**. 1996. 154 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

_____. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). **Neodiversity**, Feira de Santana, v. 3, p. 3-12, 2008.

_____. Promiscuidade generalizada em *Cattleya* (Orchidaceae): importância da hibridação e introgressão na evolução do gênero. In: ENCONTRO DE GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS: EVOLUÇÃO, SISTEMÁTICA E BIOLOGIA DE POPULAÇÕES DE ORQUÍDEAS, 30., 2013, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 2013. p. 18-24

_____. Importance of hybridization for the evolution of *Cattleya*. **Renziana**, Basel, v. 4, p. 74-79, 2014.

VAN DEN BERG, C.; CHASE, M.W. Nomenclatural notes on Laeliinae. I. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 15, n. 2, p. 115-119, 2000.

_____. Nomenclatural notes on Laeliinae. II. Additional combinations and notes. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 16, n. 2, p. 109-112, 2001.

VAN DEN BERG, C.; MARTINS, P.S. Biogeography of Brazilian *Cattleyas*: geographic distribution, morphological variability, evolutionary and taxonomic consequences. In: ORCHID CONFERENCE, 15., 1996. Rio de Janeiro. **Proceedings...** Turriers: Naturalia Publ., 1998. p. 315-320.

VAN DEN BERG, C.; SOTO-ARENAS, M.A. Subtribe Laeliinae. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. (Ed.). **Genera Orchidacearum**. 4. Epidendroideae (part 1). Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 181–186.

VAN DEN HOF, K.; VAN DEN BERG, R.G.; GRAVENDEEL, B. Chalcone synthase gene lineage diversification confirms allopolyploid evolutionary relationships of European rostrate violets. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 25, p. 2099-2108, 2008.

VAN DEN BERG, C.; GOLDMAN, D.H.; FREUDENSTEIN, J.V.; PRIDGEON, A.M.; CAMERON, K.M.; CHASE, M.W. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 92, n. 4, p. 613-624, 2005.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.; DRESSLER, R.; WHITTEN, W.; SOTO-ARENAS, M.; CHASE, M. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 417-430, 2009.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for a DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

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.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WITHNER, C. **The Cattleyas and their relatives**: the Cattleyas. Portland: Timber Press, 1988. v. 1, 147 p.

_____. **The Cattleyas and their relatives**: Schomburgkia, Sophronitis, and other South American genera. Portland: Timber Press, 1993. 154 p.

WORLD checklist of selected plant families. Kew: Royal Botanic Gardens, 2011. Disponível em: <apps.kew.org/wcsp/incfamilies.do>. Acesso em: 09 nov. 2014.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population: The theory of gene frequencies**. Chicago: University of Chicago, v.2, 1969. 520 p.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification. **Genomics**, New York, v. 20, p. 176-183, 1994.

ZINCK, W.R.; RAJORA, O.P. Post-glacial phylogeography and evolution of a wide-ranging highly-exploited keystone forest tree, eastern white pine (*Pinus strobus*) in North America: single refugium, multiple routes. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 16, n. 1, p. 56, 2016.

APÊNDICES

Apêndice ARegiões plastidiais e nucleares testadas para obtenção de sequências de DNA nas populações de *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana*.

Região	Sequência	Referência	Desnaturação	Amplificação	Nº de ciclos na amplificação	Extensão
<i>atpB</i> <i>rbcL</i>	AGC ACT CAT AGC YAC AGC TC TGC TTT AGT YTC TGT TTG TGG TG	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 56°C (1 min) + 65°C (5 min)	35	65°C (5 min)
<i>atpI</i> <i>atpH</i>	TAT TTA CAA GYG GTA TTC AAG CT AYC CAG CAG CAA TAA C	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>psbA</i> <i>trnH</i> ^(GUG)	GTTATGCATGAACGTAATGCTC CGCGAATGGTGGATTACAAATC	Shaw et al. (2005)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>psbD</i> <i>trnT</i> ^(GGU)	CTC CGT ARC CAG TCA TCC ATA CCC TTT TAA CTC AGT GGT AG	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>psbJ</i> <i>petA</i>	ATA GGT ACT GTA RCY GGT ATT AAC ART TYG ARA AGG TTC AAT T	Shaw et al. (2007)	80°C (2 min)	95°C (1 min) + 53°C (1 min) + 65°C (3 min)	30	65°C (5 min)
<i>rpl16intron F</i> <i>rpl16intron R</i>	CCY YTC ATT CTT CCT CTA TGT TG TGC TTA GTG TGT GAC TCG TT	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 56°C (1 min) + 65°C (5 min)	35	65°C (5 min)
<i>rpl32-R</i> <i>ndhF</i>	CCA ATA TCC CTT YYT TTT CCA A GAA AGG TAT KAT CCA YGM ATA TT	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>rpoB</i> <i>trnC</i> ^(GCA)	CKACAA AAY CCY TCR AAT TG CAC CCR GAT TYG AAC TGG GG	Shaw et al. (2005)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + TD50-57°C (1 min) + 65°C (5 min)	30	65°C (5 min)
<i>rpS16x1</i> <i>trnKx2F2</i>	AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>rpS16</i> <i>trnQ</i> ^(UUG)	GTT GCT TTY TAC CAC ATC GTT T GCG TGG CCA AGY GGT AAG GC	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>rpl32-F</i> <i>trnL</i> ^(UAG)	CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>trnS</i> <i>trnG</i>	GTAGCGGGAATCGAACCCGCATC AGATAGGGATTCTGAACCCTCGGT	Shaw et al. (2005)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)

<i>TrnV^(UACx2)</i> <i>ndhC</i>	GTC TAC GGT TCG ART CCG TA TAT TAT TAG AAA TGY CCA RAA AAT ATC ATA TTC	Shaw et al. (2007)	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 52°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
ITS17SE	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	Sun et al. (1994)	94°C (3 min)	94°C (1 min) + 54°C (1 min) + 72°C (1 min 30 s)	28	72°C (7 min)
ITS26SE	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	Sun et al. (1994)				
ITS92*	AAGGTTTCCGTAGGTGAAC	Desfeaux et al. (1996)				
ITS4*	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)				
ETS-Orchid3 F	CATATGAGTTGTTGCGGACCWT	Monteiro (2007)	94°C (3 min)	94°C (45 seg) + grad56-60°C (45 seg) + 72°C (1min 30seg)	30	72°C (7 min)
18S-IGG4 R	AGACAAGCATATGACTACTGGCAGG					
XDH-X502F	TGT GAT GTC GAT GTA TGC	Gorniak et al. (2010)	94°C (2 min)	94°C (45 seg) + TD[52-46]°C (45 seg) + 72°C (1 min 30 seg)	6	72° (5 min)
XDH-X1599R	GWG AGA GAA AYT GGA GCA AC			94°C (45 seg) + 47°C (45 seg) + 72°C (1min 30seg)	28	
XDH-X551F	GAA GAG CAG ATT GAA GAW WGC C	Gorniak et al. (2010)	94°C (2 min)	94°C (45 seg) + TD[52-46]°C (45 seg) + 72°C (1 min 30 seg)	6	72° (5 min)
XDH-X1591R	AAY TGG AGC AAC TCC ACC A			94°C (45 seg) + 47°C (45 seg) + 72°C (1min 30seg)	28	
<i>ycfI 3720F</i> <i>ycfI 5500R</i> <i>ycfI intF*</i> <i>ycfI intR*</i>	TACGTATGTAATGAACGAATGG GCTGTTATTGGCATCAAACCAATAGCG GATCTGGACCAATGCACATATT TTTGATTGGGATGATCCAAGG	Neubig et al. (2009)	94°C (1 min)	94°C (30 seg) + 53°C (40 seg) + 72°C (50 seg)	40	72° (5 min)

*marcadores utilizados apenas na reação de sequenciamento.

Apêndice B

Resultado da análise da AMOVA para os valores de F_{ST} par a par para todas as populações das espécies *Cattleya loddigesii* e *C. harrisoniana*

		ITS																
cpDNA		H1	H2	Hib3	Hib4	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13
	H1		-0,061	0,805	0,831	0,519	0,739	0,882	0,707	0,890	0,730	-	0,716	0,740	0,643	0,850	0,555	0,573
	H2	0,148		0,857	0,887	0,585	0,809	0,933	0,790	0,953	0,791	-	0,770	0,809	0,701	0,930	0,618	0,638
	Hib3	0,288	0,059		0,277	0,147	0,022	0,273	0,025	0,117	0,072	-	0,483	0,564	0,310	0,742	0,178	0,237
	Hib4	0,556	0,067	-0,018		0,147	0,203	-0,050	0,204	0,235	0,218	-	0,546	0,611	0,402	0,798	0,218	0,381
	L1	0,430	0,184	0,317	0,384		-0,002	0,227	-0,048	0,156	0,012	-	0,222	0,271	0,050	0,415	-0,068	0,019
	L2	0,497	0,007	-0,069	0,000	0,323		0,297	-0,170	0,182	-0,149	-	0,236	0,327	0,040	0,584	-0,020	0,023
	L3	0,291	0,048	0,061	0,062	0,078	0,012		0,357	0,241	0,316	-	0,653	0,733	0,512	0,895	0,325	0,465
	L4	0,226	0,026	0,111	0,152	0,027	0,063	0,023		0,260	-0,186	-	0,116	0,184	-0,043	0,507	-0,093	-0,012
	L5	0,529	0,040	-0,040	0,000	0,356	0,000	0,040	0,111		0,209	-	0,628	0,725	0,458	0,932	0,236	0,402
	L6	0,159	0,005	0,010	0,000	0,092	-0,055	-0,044	-0,197	-0,024		-	0,174	0,273	0,011	0,516	-0,034	0,028
	L7	0,195	0,057	0,078	0,116	-0,058	0,058	-0,010	-0,163	0,090	-0,073		-	-	-	-	-	-
	L8	0,218	0,045	0,033	0,023	0,172	-0,027	-0,010	0,040	0,001	-0,015	0,048		-0,066	-0,036	0,064	0,069	0,116
	L9	0,594	0,463	0,451	0,593	0,490	0,546	0,529	0,392	0,571	0,437	0,289	0,498		0,049	-0,036	0,108	0,160
	L10	0,106	0,003	-0,053	-0,018	0,089	-0,069	-0,023	-0,034	-0,040	-0,039	-0,019	-0,028	0,303		0,238	-0,056	-0,046
	L11	0,312	0,079	0,141	0,167	-0,033	0,114	-0,082	0,001	0,143	-0,017	-0,049	0,033	0,505	0,002		0,267	0,345
	L12	0,919	0,686	0,851	0,974	0,390	0,969	0,736	0,553	0,972	0,631	0,340	0,716	0,727	0,545	0,619		-0,029
	L13	0,400	0,157	0,274	0,331	-0,120	0,274	0,027	0,019	0,305	0,061	-0,062	0,133	0,497	0,066	-0,069	0,462	

ANEXOS

Anexo A

Comparação da morfologia de um indivíduo da população de Porangaba-SP (superior) com um indivíduo da população de Carlópolis-PR (inferior)