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

Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR

Jucelene Fernandes Rodrigues

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

**Piracicaba
2010**

Jucelene Fernandes Rodrigues
Ecóloga

**Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares
ISSR**

Orientador:
Prof. Dr. GIANCARLO CONDE XAVIER OLIVEIRA

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

**Piracicaba
2010**

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

Rodrigues, Jucelene Fernandes

Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR / Jucelene Fernandes Rodrigues. - - Piracicaba, 2010.
81 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Diversidade genética 2. Filogenia 3. Marcador molecular 4. Orchidaceae 5. Orquídea
6. Plantas epífitas I. Título

CDD 635.93415
R696d

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

Aos meus pais Jaime (*in memoriam*) e Aparecida,
e ao meu marido Antonio Carlos
com amor e profunda gratidão

Dedico

À pessoa mais doce e generosa que já conheci,
minha avó Akie Kawabata (*in memoriam*)

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse trabalho:

Aos meus dois orientadores,

Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira, pela orientação, pela confiança, por ter sido sempre tão gentil e pelas excelentes aulas de Evolução.

Profa. Dra. Samantha Koehler da Universidade Federal de São Paulo, pela orientação, por estar sempre tão presente em cada etapa, mesmo que distante, pela confiança, por todos os ensinamentos e por proporcionar o privilégio de trabalhar com orquídeas.

À Dra. Aluana Gonçalves de Abreu do Instituto Agrônomo de Campinas, pela valiosa colaboração, e por toda ajuda nas análises de dados de diversidade genética.

Ao prof. Dr. Cássio van den Berg da Universidade Federal de Feira de Santana/BA, pela colaboração na fase inicial do projeto.

Ao prof. Dr. Eduardo Luis Martins Catharino do Instituto de Botânica de São Paulo, que gentilmente concedeu abrigo as amostras de orquídeas mantidas em cultivo, utilizadas neste trabalho, no Orquidário Dr. Carlos Hoehne; pelas conversas enriquecedoras e dicas preciosas.

À profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi do Instituto Agrônomo de Campinas, por disponibilizar parte das amostras dos iniciadores ISSR.

À profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey pela disponibilização de equipamentos do laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada.

Ao departamento de Genética pela estrutura e disponibilidade de funcionários e carros para as viagens de coleta de campo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

Aos funcionários do Departamento de Genética: Neuza, Léia, Wilma, Fernandinho, Carmo, Carlos, Natálio, Berdan, Valdir, e ao amigo Reginaldo Lara (Capela). Ao funcionário Josué Pontes, do Orquidário do Departamento de Genética Prof. Paulo Sodero Martins, pela disponibilidade de material para extração de DNA, pelas dicas e pela dedicação no cultivo das espécies de orquídeas da coleção.

Ao Dr. Wellington Foster da Universidade Estadual de Campinas, pelo acompanhamento e ajuda na viagem de coleta de campo ao Parque Nacional do Caparaó em Minas Gerais. Ao Engenheiro Agrônomo Otávio Ribeiro, pela companhia e auxílio na viagem de coleta de campo à Serra do Espinhaço, Ouro Branco em Minas Gerais. A estagiária Karina Zorzetti do Instituto de Botânica, pelo carinho com que sempre me recebeu em todas as viagens de coleta que fiz ao Orquidário.

Aos companheiros de laboratório: Fernando Ângelo Piotto, Carolina Grando e Mariana Novello pela amizade, pelas longas conversas, dicas preciosas e por toda ajuda que sempre me deram, desde antes do mestrado. Ao técnico de laboratório Carlos Alberto Veríssimo pelo apoio no início do mestrado, e às estagiárias Marília Barros-Neto e Gabriele Valadão, pela companhia nas viagens, pela ajuda nas tarefas diárias do lab. e a todos pelo ótimo convívio.

Aos amigos da pós-graduação: Guilherme Pereira, Larissa Mara de Andrade, Thiago Fonseca Mezette, Felipe Biguzzi, Júlio César Mistro, Graciela Sobierajsky, Philip Traldi Wysmierski, Marcos Bohrer Siqueira e Augusto Diniz, pelas conversas, ajuda nas disciplinas e no laboratório. Ao Wellington Ferreira do Nascimento e Nancy Farfán Carrasco pela amizade e companherismo, e por tornarem mais leve e divertida a rotina pesada de estudos para as disciplinas da pós, e ao Fernando Shirahige pela força na prova do doutorado.

Aos amigos de toda uma “vida” e precursores: Maria Massumi, Rodrigo Hashimoto, Valdelice Murata, Daniela Ayako Onodera, Paula Suguiyama e Thaís Ikuta, nunca vou esquecer o que fizeram por mim.

A minha querida família: meu pai Jaime (*in memoriam*), minha mãe Aparecida, minha irmã Jussara e irmãos Cléber e Haiton, meus sobrinhos Alexandre Ichiro, Ana Clara Akie, Airi e Daiki, pela dedicação, apoio e pelo amor em todo percurso de minha vida. Em vocês encontro forças para melhorar a cada dia! Aos familiares e ao Pedro pelo apoio e carinho.

Ao meu marido Antonio Carlos, meu grande incentivador, pelo amor incondicional, pela força nos momentos de desânimo, por ter sido paciente na minha ausência, pelo respeito ao meu trabalho e as minhas decisões.

A Deus por tudo, sempre.

“As pessoas que passam por nossas vidas, nunca vão só, deixam um pouco de si e
levam um pouco de nós”

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivos.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Conceitos e delimitação de espécies.....	19
2.2 Marcadores moleculares ISSR	21
2.3 Sistema de estudo	23
2.4 Família Orchidaceae e a genética da conservação.....	30
2.4.1 Implicações de estudos filogenéticos para a conservação de orquídeas.....	30
2.4.2 Implicações de estudos de diversidade genética para a conservação de orquídeas.....	36
2.5 Análises estatísticas	40
2.5.1 Neighbor-joining	40
2.5.2 Máxima parcimônia.....	41
2.5.3 Análise de variância molecular (AMOVA).....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 Extração de DNA.....	47
3.2 Seleção e otimização de iniciadores de ISSR.....	48
3.3 Análise dos dados	49
3.3.1 Análises filogenéticas	50
3.3.2 Análises de genética de populações	50
4 RESULTADOS	53
4.1 Teste e seleção dos iniciadores ISSR	53
4.2 Análises filogenéticas	54
4.3 Análises de genética de populações.....	57
5 DISCUSSÃO	61
5.1 Estratégias de conservação	65
6 CONCLUSOES	67
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR

As orquídeas são a maior família das plantas monocotiledôneas, sendo o Brasil um dos países contém grande diversidade de espécies. As orquídeas são, em sua maioria, alógamas e possuem mecanismos sofisticados para evitar a autopolinização. Os insetos são os agentes polinizadores mais comuns, mas também podem ser polinizados por aves como beija-flores. Tradicionalmente as espécies *Cattleya coccinea* e *C. mantiqueirae* tem sido reconhecidas como distintas de acordo com caracteres morfológicos, distribuição geográfica e época de floração. Esses critérios, entretanto, não permitem a identificação clara de espécies, uma vez que muitos indivíduos apresentam morfologia e fenologia intermediárias. Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo contribuir para o conhecimento taxonômico e evolutivo de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya*. Especificamente, propõe-se rever a atual delimitação entre as espécies *C. coccinea* e *C. mantiqueirae* e caracterizar a diversidade genética entre e dentro de populações dessas espécies a partir de marcadores moleculares ISSR. Para testar se a atual delimitação de espécies corresponde a linhagens filogenéticas distintas, foram realizadas coletas em seis localidades da região Sudeste. Foram testados 20 iniciadores ISSR, dos quais 13 foram otimizados para obtenção de dados. Os géis de ISSR obtidos foram utilizados para construção de uma matriz binária representando a presença/ausência de fragmentos amplificados. A matriz contendo 173 indivíduos e 295 caracteres foi analisada com algoritmo de *neighbor-joining* e o critério de parcimônia máxima para obtenção de hipóteses filogenéticas. Os resultados indicam que as espécies tradicionalmente reconhecidas, *C. coccinea* e *C. mantiqueirae*, não constituem grupos monofiléticos e, portanto, não podem ser reconhecidas como espécies distintas de acordo com o conceito filogenético de espécies. Os resultados também apontam que as populações amostradas constituem grupos monofiléticos com altos valores de confiança e que o complexo *C. coccinea*-*C. mantiqueirae* não constitui um grupo monofilético. O parafiletismo do grupo é determinado pela posição da população de Lima Duarte/MG, que constitui um clado irmão da espécie *C. brevipedunculata* (ocorrente na Serra do Espinhaço) e *C. wittigiana* (restrita ao Estado do Espírito Santo). Os resultados de análises de genética de populações corroboram com os resultados da análise filogenética e indicam que as populações possuem baixos índices de diversidade genética entre indivíduos e que a maior diversidade encontra-se entre populações. Por serem plantas com alto valor ornamental e sofrerem com ações antrópicas constantes, esse estudo foi de fundamental importância para permitir estratégias viáveis para a manutenção e conservação da diversidade genética dessas populações de orquídeas.

Palavras chave: Orchidaceae; filogenia; diversidade genética; *Sophronitis coccinea*; *Sophronitis mantiqueirae*; ISSR; laeliinae

ABSTRACT

Species Delimitation and genetic diversity in *Cattleya coccinea* Lindl. and *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg complex (Orchidaceae) based on ISSR molecular makers

Orchids represent the largest family of monocots, with great diversity of species in Brazil. These plants are generally allogamous and bear sophisticated mechanisms to avoid self-pollination. Insects are by far the most common pollinators, but birds (i.e. hummingbirds) may also be important. Within *Cattleya*, the species *C. coccinea* and *C. mantiqueirae* have been distinguished by morphological characters, geographical distribution and flowering period. Such criteria, however, do not allow a clear identification of species, since many specimens show intermediate morphological and phenological variation. The goal of this study is to contribute to the understanding of taxonomical and evolutionary aspects of Brazilian orchids, especially within the genus *Cattleya*. In order to achieve that I revised current species limits within the *C. coccinea*-*C. mantiqueirae* species complex. The study was based on phylogenetic and genetic diversity analyses among and within populations considering ISSR molecular markers. Six populations from Southeastern Brazil were considered. I tested 20 ISSR primers, of which 13 were used in this study. Presence/absence of fragments visualized in agarose gels were used to build a binary matrix. The analyses considered 173 individuals and 295 characters (fragments). Phylogenetic analyses were performed according to distance (neighbor-joining) and parsimony criteria. According to the results, the species *C. coccinea* and *C. mantiqueirae* do not constitute monophyletic groups and, therefore, cannot be recognized as distinct according to the phylogenetic species criterion. Also the *C. coccinea*-*C. mantiqueirae* species complex is paraphyletic considering the closely related species *C. brevipedunculata* (from Serra do Espinhaço) and *C. wittigiana* (from Espírito Santo State). The population of Lima Duarte/MG is phylogenetically more closely related to such species than to other populations of *C. coccinea* and *C. mantiqueirae*. On the other hand, the studied populations comprise strong monophyletic groups. Population genetics analyses agree with phylogenetic results. All populations show low diversity indices among individuals. Also, the greatest portion of genetic diversity was found between populations. Orchids belonging to the *C. coccinea*-*C. mantiqueirae* species complex are high ornamental species, with great anthropogenic pressure. For this reason this study was important to allow conservation strategies to maintain and monitor genetic and morphological diversity of populations.

Keywords: Orchidaceae; phylogeny; genetic diversity; *Sophronitis coccinea*; *Sophronitis mantiqueirae*; ISSR; laellinae

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade é definida como a variedade de formas de vida existentes no planeta (WILSON, 1994). Estima-se que 20% de toda essa diversidade biológica esteja presente em território brasileiro (BRASIL, 2004). No entanto, ações antrópicas realizadas de maneira indiscriminada em ambientes naturais têm ocasionado a perda de habitats e a fragmentação florestal, consequentemente reduzindo a diversidade biológica (EHRlich, 1988).

A conservação da diversidade genética é essencial para a manutenção de todos os níveis de biodiversidade, pois assegura a sobrevivência a longo prazo das espécies por manter o vigor e o potencial para a adaptação evolutiva, bem como o funcionamento dos ecossistemas (YOUNG; BOYLE, 2000; LUCK; DAILY; EHRlich., 2003). A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) considera como prioridade de conservação três níveis primários da biodiversidade: ecossistemas, espécies e variabilidade genética.

Um dos principais temas abordados em estudos de genética da conservação é a resolução de incertezas taxonômicas. Isso porque, o conhecimento taxonômico da maioria das espécies é resumido à variação macromorfológica e informações limitadas sobre a distribuição geográfica, sendo, muitas vezes, mesmo esse tipo de informação escassa ou pouco estudada. Além disso, a delimitação de táxons baseada em morfologia e biogeografia *per se* pode esconder linhagens crípticas, comprometendo esforços para a definição de unidades de manejo sustentável e de conservação. Sendo assim, é essencial o estabelecimento do *status* taxonômico dos organismos de acordo com a maior diversidade de caracteres possível (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004).

O campo da genética da conservação também incluiu o estudo da diversidade genética em populações naturais. Essa área de estudo compreende a descrição dos níveis de variabilidade genética dentro e entre populações, levando-se em consideração que muitas populações apresentam tamanho reduzido e consequentemente podem sofrer os efeitos da endogamia, deriva genética e redução ou ausência de fluxo gênico (TANSLEY; BROWN, 2000). Portanto, a manutenção da diversidade genética em populações fragmentadas depende do monitoramento e compreensão desses processos evolutivos. Somente com tal conhecimento disponível é possível elaborar práticas de manejo visando a conservação e a utilização dos recursos genéticos de maneira sustentável (HARTL; CLARK, 1997).

As orquídeas podem ser encontradas em todos os continentes, com exceção dos pólos e simbolizam a urgência pela conservação da flora mundial. A ação predatória de colecionadores devido ao grande potencial ornamental da família, bem como a degradação e destruição de habitats em todo planeta, levaram muitas espécies a beira da extinção (PILLON; CHASE, 2007). Por este motivo, a família Orchidaceae apresenta mais espécies listadas como ameaçadas na Lista Vermelha da IUCN do que qualquer outra família de plantas (IUCN, 1999). Além disso, orquídeas estão entre as plantas mais carismáticas e despertam respostas emocionais do público, com isso atraem um nível substancial de financiamento público para a conservação. O Royal Botanic Gardens, Kew que recebeu um milhão de libras (aproximadamente 2,6 milhões de reais) para conservar uma única espécie de orquídea no Reino Unido, a *Cypripedium calceolus* (RAMSAY; DIXON, 2003).

A ameaça à conservação de orquídeas contrasta com a grande diversidade da família - uma das maiores entre as plantas vasculares, correspondendo a 10% de todas as Angiospermas (OTERO; FLANAGAN, 2006). Tal fato faz das orquídeas um grupo-chave para a conservação, como também para compreensão de processos de especiação. Darwin (1862) foi o primeiro pesquisador a se interessar e reconhecer que as orquídeas oferecem ótimos exemplos para ilustrar processos evolutivos.

O primeiro passo para a conservação e manejo de uma espécie é resolver qualquer incerteza taxonômica existente e delinear as unidades de manejo dentro da espécie (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004). Entretanto, a delimitação de espécies pode ser bastante complexa. Primeiramente, a compreensão da variação de caracteres morfológicos e padrões de distribuição geográfica são insatisfatórios em muitos grupos de orquídeas, gerando incertezas em relação à delimitação de espécies.

Uma das maneiras de abordar a delimitação de espécies é o desenvolvimento de estudos filogenéticos baseados em sequências de DNA, que estão sendo frequentemente utilizados como uma ferramenta alternativa e complementar a estudos taxonômicos através da identificação de grupos monofiléticos em nível infraespecífico e interespecífico (WHITTEN; WILLIAMS; CHASE, 2000; WILLIAMS et al., 2001). Entretanto, apesar do grande número de iniciadores descritos para diversas regiões dos genomas nuclear e de cloroplasto de plantas, estudos filogenéticos em baixos níveis taxonômicos são ainda limitados pelo desconhecimento de regiões de evolução rápida (DEPRÉS et al., 2003). Visando suprir essa necessidade,

pesquisadores têm utilizado cada vez mais marcadores moleculares dominantes para estudos filogenéticos considerando espécies proximamente relacionadas (KOOPMAN, 2005).

Apesar dos marcadores moleculares ISSR ainda serem pouco explorados para estudos de delimitação de espécie, eles oferecem uma série de vantagens na sua aplicação como o baixo custo, requerem pouca infra-estrutura, apresentam boa replicabilidade e rapidez na obtenção de informações para o desenvolvimento de estudos filogenéticos e de diversidade genética (WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998; WOODS et al., 2005; SLOTTA; PORTER, 2006). Os poucos estudos desenvolvidos com plantas baseados em marcadores ISSR já comprovam seu potencial para delimitação de espécies (DOGAN; DURAN; HAKKI, 2007; WOOD; NAKAZATO, 2009), bem como para compreensão de processos evolutivos, e para uso em genética da conservação (XIAO et al., 2004; BRANDÃO, 2008).

1.1 Objetivos

O presente estudo visa contribuir para o conhecimento taxonômico e evolutivo de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya* a partir do estudo de marcadores ISSR. Especificamente, propõe-se:

1. Rever a atual delimitação entre as espécies *Cattleya coccinea* e *Cattleya mantiqueirae*.
2. Caracterizar a diversidade genética entre e dentro de populações de *C. coccinea* e *C. mantiqueirae*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Conceitos e delimitação de espécies

Nas duas últimas décadas têm-se notado um considerável aumento de interesse no campo da biologia evolutiva por estudos relacionados à compreensão de processos de especiação (GOLDMAN; YANG, 2008). Para se estudar especiação é necessário definir claramente o que são *espécies*. Entretanto, desde o século XIX, diversos autores, principalmente sistematas, têm debatido conceitos de espécie. Esses debates intensificaram-se na década de 1930 com o surgimento da Teoria Sintética da Evolução e, mais ainda, com o estabelecimento da sistemática filogenética como método para propor classificações (HENNIG, 1950; CRACRAFT, 2000).

Atualmente existem pelo menos 24 conceitos distintos de espécies disponíveis (MAYDEN, 1997). Isso ocorre porque o conceito adotado depende do objetivo do pesquisador. Coyne; Orr (2004) apresentam cinco aplicações distintas para o conceito de espécies: (1) classificação de organismos; (2) identificação de unidades descontínuas na natureza; (3) compreensão de processos que originam unidades descontínuas na natureza; (4) reconstrução da história evolutiva de organismos e (5) aplicação de um conceito ao maior número de organismos possível.

É claro que nenhum conceito pode satisfazer todos os distintos objetivos acima apresentados. Entretanto, é possível distinguir dois tipos principais de abordagens que consideram o delineamento de espécies. Taxonomistas estão interessados em propor chaves e descrições que permitam a identificação de unidades discretas na natureza. O critério tradicionalmente empregado para tal é a descontinuidade morfológica (critério morfológico; e.g. HOEHNE 1949, PABST; DUNGS 1975, 1977). De forma complementar, estudos filogenéticos têm sido beneficiados do desenvolvimento e o progressivo baixo custo de técnicas moleculares, empregando marcadores moleculares para a compreensão de relações de parentesco, especialmente em grupos morfológicamente homogêneos (SMITH et al. 2004; DEVEY et al. 2008).

Embora os critérios de exclusividade sugeridos pelo critério filogenético de espécies sejam práticos e aplicáveis a um grande conjunto de organismos, sua desconexão com o processo de especiação gera problemas segundo Hudson; Coyne (2002). Isso porque para que a monofilia recíproca seja observada em um par de espécies, mesmo considerando uma amostragem de

múltiplos locos, é necessário que o evento de divergência tenha ocorrido há um período substancial de tempo. Diversos estudos têm demonstrado que a discordância entre árvores de genes e espécies são comuns – de fato, quanto mais recente for o processo de divergência, maior será a discordância (TEMPLETON, 2001). Isto representa um problema tanto para a inferência de limites de espécies quanto para compreensão de processos de especiação. Consequentemente, para o uso eficiente de dados genéticos para delimitação de espécies é necessário que o processo de divergência de espécies e que a contribuição potencial de processos aleatórios na discordância entre árvores de genes e limites de espécies sejam considerados (TEMPLETON, 2001; KNOWLES; CARSTENS, 2007; CUMMINGS; NEE; SKAW, 2008).

Cabe ressaltar que espécies são hipóteses, cuja delimitação, proposta por determinado autor e baseada em critérios explícitos ou implícitos, pode ser testada à luz de novas evidências, podendo ser corroborada ou refutada. Nesse aspecto, a sistemática e a genética de populações, tradicionalmente abordadas através de estratégias distintas, encontram-se em um desafio em comum: compreender a origem e manutenção de espécies.

A acurada delimitação de espécies é um fator crucial para a descrição da diversidade biológica e, portanto, deve haver um esforço coletivo para que a lacuna na comunicação entre as diferentes áreas de estudo, como a filogeografia, a ecologia, a genética de populações, a etologia e outras, seja minimizada e o problema deixe de ser negligenciado (DAYRAT, 2005). Assim, não existe uma única fonte de dados que deva ser adotada para a delimitação de espécies. Para tanto, é necessário uma abordagem que integre múltiplas linhas de evidência, além de métodos de análise explícitos que sejam úteis para esclarecer possíveis inconsistências (DAYRAT, 2005).

Na família Orchidaceae, os estudos filogenéticos têm sido desenvolvidos desde a década de 1980, com o objetivo de rever classificações em nível de subfamílias, tribos e subtribos (DRESSLER, 1993; CAMERON et al., 1999; PRIDGEON et al., 2001, 2003 e 2005; WHITTEN; WILLIAMS; CHASE, 2000; VAN DEN BERG; CHASE, 2000; VAN DEN BERG; CHASE, 2004; CHASE, 2005; FREUDENSTEIN et al. 2004; PANSARIN; AMARAL, 2008). Os estudos de relações filogenéticas nos níveis hierárquicos mais altos incentivaram o desenvolvimento de estudos sobre delimitação de espécies e processos de especiação utilizando diferentes abordagens. Entre os diferentes enfoques utilizados estão estudos filogeográficos (COZZOLINO et al., 2003, que estudaram a filogeografia do raro gênero do mediterrâneo *Anacamptis*); estudos sobre especiação poliplóide, destaca-se o trabalho de Wallace, 2003, que apresentou inferências a

partir de marcadores moleculares sobre a origem de poliplóides no gênero *Platanthera*; e a circunscrição e delimitação de unidades descontínuas na natureza, como exemplo, Goldmam; van den Berg; Griffith (2004) que realizaram estudos morfométricos para examinar a circunscrição e delimitar taxa infraespecíficos em *Calopogon* e Koehler et al. (2008) que revisaram a delimitação de espécies no gênero *Christensonella* a partir de árvores filogenéticas.

2.2 Marcadores moleculares ISSR

Os primeiros marcadores moleculares utilizados para detectar a variação genética foram os marcadores isoenzimáticos, na década de 1960, que baseavam-se na detecção de polimorfismo a partir da carga elétrica de proteínas (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995). Duas décadas mais tarde surgiram os marcadores moleculares oriundos diretamente da análise da molécula de DNA, trazendo assim uma série de vantagens, como o acesso direto ao genótipo de um indivíduo, pois enquanto que os marcadores moleculares isoenzimáticos amostram apenas regiões ativas na expressão gênica, alguns marcadores moleculares de DNA permitem a amostragem de todo o genoma da espécie estudada, enquanto que outros realizam amostragem de regiões específicas da molécula de DNA, como os microssatélites e sequenciamentos ITS (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Em 1987, Mullis e Faloona proporcionaram uma grande revolução na área genética molecular, quando publicaram a criação de uma nova técnica chamada PCR (Polymerase Chain Reaction) que possibilitava a síntese enzimática de milhões de cópias de um determinado fragmento de DNA. Tal advento proporcionou o surgimento de outros tipos de marcadores moleculares, entre eles os marcadores moleculares dominantes: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (VOS et al., 1995) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (GUPTA et al. 1994; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Nesses marcadores os alelos são revelados pela presença ou ausência de bandas, onde cada uma dessas bandas correspondendo ao resultado da amplificação de determinados fragmentos da molécula de DNA. Entretanto não é possível detectar se o fragmento amplificado trata-se de uma alelo homozigoto ou heterozigoto (LOPES et al., 2002) e, por essa razão, marcadores dominantes são considerados menos informativos que os marcadores moleculares codominantes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores dominantes ISSR foram desenvolvidos por Gupta et al. (1994) e Zietkiewicz; Rafalski; Labuda (1994) e são baseados na técnica de PCR. Os produtos da reação de PCR produzidos na reação de ISSR correspondem a sequências de tamanhos diferentes que se localizam entre regiões repetidas de microssatélites, idênticas e orientadas em direções opostas. Na reação é utilizado um único iniciador que contém de 16 a 25 pares de bases e é composto de dinucleotídeos ou trinucleotídeos que ancoram na extremidade 5' ou 3' da fita de DNA (WOLFE; LISTON, 1998). Marcadores ISSR contornam a problemática do conhecimento prévio das sequências que flanqueiam os microssatélites (LIU; WENDEL, 2001).

Assim como os marcadores RAPD, os ISSR são uma técnica simples e podem ser utilizados para estudos genéticos em quaisquer grupos de organismos. Os RAPD têm sido utilizados em diversos estudos de análise de diversidade genética em populações naturais (BUSO; RANGEL; FERREIRA, 1998; KELLER, 2000; ZUCCHI, 2002; CAVALLARI, 2006), mostrando-se como uma ferramenta eficiente para descrição de padrões de diversidade genética e para delimitação de espécies (COLLINS; MILL; MÖLLER, 2003; ANAND, et al., 2010). Porém quando comparados com marcadores ISSR, os marcadores RAPD apresentam certas desvantagens como a apresentação de níveis mais baixos de polimorfismo (YANG et al., 1996; NAGAOKA; OGIHARA, 1997; PARSONS et al. 1997). Além disso, os iniciadores de ISSR são mais robustos devido ao fato de apresentar maior superfície de ancoragem e por possuírem maiores temperaturas de reassociação, produzindo assim um aumento na reprodutibilidade dos produtos de PCR (TSUMURA; OHBA; STRAUSS, 1996; WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998).

Os marcadores ISSR oferecem algumas desvantagens, pois apresentam menor nível de polimorfismo se comparados com marcadores SSR (WOLFE; LISTON, 1998) e que os marcadores AFLP (ARCHAK et al., 2003). Além disso, marcadores moleculares dominantes, como os AFLP, ISSR e RAPD apresentam fragmentos de DNA co-migrantes que podem representar locos distintos, mas serem interpretados como homólogos devido ao tamanho idêntico (BUSSELL; WAYCOTT; CHAPPILL, 2005). As vantagens da utilização da técnica de ISSR estão na pequena demanda de quantidade de DNA por reação, na rapidez na obtenção das informações genéticas relevantes para os estudos de diversidade genética em populações e também porque requerem pouca infra-estrutura de equipamentos de laboratórios para a execução dos experimentos, comparados com outros marcadores (WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998).

Até há pouco tempo o uso de marcadores ISSR para estudos de diversidade genética estava restrito apenas a espécies de plantas cultivadas (KANTETY et al., 1995; WOLFF; ZIETKIEWICZ; HOFSTRA, 1995; OLIVEIRA; RICHTER; BENNETZEN, 1996; TSUMURA; OHBA; STRAUSS, 1996; YANG et al., 1996; FANG et al., 1997; GOLDWIN; AITKEN; SMITH, 1997; NAGAOKA; OGIHARA 1997; PARSONS et al., 1997). Contudo, a utilização de marcadores ISSR em estudos sobre eventos de hibridização e diversidade genética em populações naturais vem crescendo gradativamente, como mostram os trabalhos de Robinson et al. (1997), Wolfe; Liston (1998), Wolfe; Xiang; Kephart (1998), Wolfe; Randle (2001), Souza et al. (2005), Woods et al. (2005), Slotta; Porter (2006), Souza et al. (2008). Nos últimos anos, também é possível observar um aumento considerável de estudos que utilizam os marcadores ISSR como ferramenta para a delimitação de espécies de plantas como Hao et al. (2002); Barker; Hauk, (2003); Krings; Xiang (2004); Slotta; Porter (2006); Kamada; Yamashiro; Maki (2007), Dogan; Duran; Hakki, (2007), Wood; Nakazato (2009), Anand et al. (2010), entre outros. Portanto apesar das limitações apresentadas, os marcadores ISSR vêm demonstrando claramente um grande potencial em estudos tanto de análises filogenéticas quanto de genética de populações naturais de plantas, além da sua utilidade já comprovada em análises de espécies cultivadas (WOLFE; LISTON; 1998).

2.3 Sistema de estudo

A família Orchidaceae é uma das maiores das angiospermas, compreendendo cerca de 25.000 espécies (CHASE, 2003) e aproximadamente 850 gêneros (CAMERON et al., 1999; CHASE, 2005), sendo sua distribuição geográfica ampla e com maior diversidade em regiões tropicais (DRESSLER, 1993). Para o Brasil, são estimadas cerca de 2.350 espécies e 200 gêneros (PABST; DUNGS, 1975).

Descrita por Bentham (1881), a subtribo Laeliinae (subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae) é constituída por 40 gêneros e 2.080 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais das Américas e Caribe (PRIDGEON et al., 2005). Dentre os gêneros brasileiros dessa subtribo destaca-se *Cattleya* Lindl., que engloba espécies muito ornamentais. São plantas epifíticas, mais raramente rupícolas ou terrestres, apresentam pseudobulbos cilíndricos, clavados

ou fusiformes. Possuem uma, duas, ou raramente três, folhas verdes, de formato elíptico, oblongo ou elíptico lanceolado, variando de coriáceas a suculentas (PRIDGEON et al., 2005). A inflorescência geralmente apresenta poucas flores, raro numerosas. A distribuição geográfica do gênero é predominantemente na América do Sul, com poucas espécies ocorrendo na América Central (PRIDGEON et al., 2005) (Figura 1).

Com o desenvolvimento de estudos filogenéticos para a subtribo Laeliinae, a circunscrição do gênero *Cattleya* e outros relacionados sofreram profundas alterações na última década (VAN DEN BERG, 2000; VAN DEN BERG; CHASE, 2000; VAN DEN BERG; CHASE, 2001; CHIRON; CASTRO NETO, 2002; VAN DEN BERG, 2008; VAN DEN BERG et al. 2009). VAN DEN BERG et. al. (2000) publicaram um primeiro estudo filogenético baseado em sequências de DNA nuclear indicando que as espécies pertencentes ao gênero *Laelia* Lindl. ocorrentes no Brasil são filogeneticamente distantes das espécies de *Laelia* do México, que inclui a espécie tipo do gênero. Baseados nesses resultados, van den Berg ; Chase (2000; 2001) transferiram as espécies brasileiras de *Laelia* para o gênero *Sophronitis* Lindl. Posteriormente, dados complementares baseados em sequências de DNA de regiões de plastídios indicaram que *Sophronitis* está, na realidade, contido dentro do gênero *Cattleya* (VAN DEN BERG et al. 2009). Portanto, de acordo com essas evidências mais recentes, *Cattleya*, como tradicionalmente reconhecido, constitui um gênero parafilético. (Figura 2). Sendo assim, van den Berg (2008) transferiu as espécies do gênero *Sophronitis* para *Cattleya*.

Tradicionalmente, o gênero *Sophronitis* (denominado aqui de '*Cattleya* grupo *Sophronitis*') tem sido caracterizado por plantas de porte pequeno, epífitas ou rupícolas, com pseudobulbos fusiformes a subcilíndricos e achatados, apresentando uma, raro duas, folhas carnosas-coriáceas de formato elíptico a oblongo ou lanceolado (PRIDGEON et al., 2005) (Figura 3). Para o grupo '*Sophronitis*' são reconhecidas atualmente nove espécies, das quais sete constituem um grupo morfológicamente coeso denominado de complexo '*Cattleya coccinea*'. Esse grupo diferencia-se de *C. cernua* Lindl. e *C. pterocarpa* Lindl. pelos pseudobulbos fusiformes a subcilíndricos, enquanto as espécies restantes apresentam pseudobulbos arredondados e pouco alongados, que crescem geralmente formando uma linha.

Figura 1 - Morfologia do gênero *Cattleya* (adaptado de Pridgeon et al., 2005)

Figura 2 - Árvore filogenética da subtribo Laellinae resultante do sequenciamento de regiões do DNA, indicando o complexo *Cattleya coccinea* (adaptada de van den Berg, et al., 2009)

As folhas geralmente têm coloração cinza-esverdeada, sendo recurvadas e com as margens voltadas para cima ao longo da nervura central. Adicionalmente, a inflorescência comporta duas a cinco flores de coloração variando de rósea a vermelho-alaranjada, com a face voltada para o chão. Ocorrem em áreas montanhosas do estado do Rio de Janeiro que incluem Serra do Mar e parte da Serra da Mantiqueira, em uma extensa área do estado de São Paulo e de Minas Gerais, estendendo-se pelo interior do Brasil, e também no Paraguai. (WITHNER, 1990). Espécies do complexo '*Cattleya coccinea*' distribuem-se pela costa litorânea entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, na Serra do Mar, em parte da Serra da Mantiqueira e na Serra do Espinhaço (FOWLIE, 1987; WITHNER, 1990).

Figura 3 - *Cattleya cernua* (adaptada de Paxton, 1853 in Withner, 1990)

Descrita por Lindley em 1836, a espécie *C. coccinea* é reconhecida pela presença de pseudobulbos mais cilíndricos que esféricos e por folhas mais estreitas e eretas, com uma nervura central vermelha e pigmentação vermelha marginal. As inflorescências apresentam uma flor de cor laranja-avermelhada, com pétalas mais arredondadas, com pontas geralmente redondas (Figura 4). Essa espécie apresenta a distribuição mais ampla do grupo, sendo encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil principalmente na Serra do Mar, em montanhas do Espírito Santo e de Minas Gerais, geralmente em altitudes entre 750 a 1000 metros (FOWLIE, 1987; WITHNER, 1990).

Uma grande variação morfológica é, entretanto, observada para essa espécie, sobretudo no que se refere à forma dos pseudobulbos, que podem se apresentar finos como “grafite de lápis” ou mais inchados sem serem arredondados (FOWLIE, 1987). A cor e forma dos segmentos da flor também pode apresentar grande variação, sendo possível encontrar flores com tons que variam entre o amarelo, o laranja e o vermelho (FOWLIE, 1987). Tal fato determinou a descrição de um grande número de táxons infraespecíficos (WHITNER, 1990). Outras observações que corroboram a grande variação morfológica dentro e entre populações foram feitas por S. Koehler e colaboradores (observações pessoais) em coletas de campo, onde populações ocorrentes em

Minas Gerais antes descritas como *C. mantiqueirae* apresentam indivíduos com caracteres morfológicos típicos de *C. coccinea*.

Figura 4 - *Cattleya coccinea*, planta coletada na Serra do Mar em Nova Friburgo/RJ, por Koehler e colaboradores

Originalmente *C. mantiqueirae* foi descrita como uma variedade de *C. coccinea* - *C. coccinea* var. *mantiqueirae* Fowlie - de acordo com as flores pequenas escarlate de populações ocorrentes na Serra da Mantiqueira (FOWLIE, 1968). Posteriormente Fowlie (1972) considerou essa variedade como espécie distinta devido a ocorrência em um hábitat diferente, a Serra da Mantiqueira, com altitude mais elevada (entre 1200 a 1890 m.s.m) e consequentemente temperaturas mais baixas. O autor também considerou o menor tamanho da planta e das flores, a distinta época de floração, a coloração e forma dos segmentos florais e folhas e a forma dos pseudobulbos (FOWLIE, 1968) (Figura 5 e 6; Tabela 1).

O reconhecimento de *C. coccinea* e *C. mantiqueirae* como duas espécies distintas é claramente problemático devido à aparente variação contínua de caracteres morfológicos diagnósticos, principalmente referente às flores, folhas e pseudobulbos (FOWLIE, 1987; WHITNER, 1990) (Tabela 1). Além disso, observações em campo feitas por S. Koehler e colaboradores sugerem que não existe uma separação morfológica clara entre populações da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira, conforme proposto por autores prévios.

Figura 5 - *Cattleya mantiqueirae*, planta coletada na Serra da Mantiqueira em Alto Caparaó/MG (Vale Encantado), por Koehler e colaboradores. Planta em vista frontal

Figura 6 - *C. mantiqueirae* em vista lateral, com detalhe das folhas e pseudobulbos

Tabela 1 - Caracteres morfológicos diagnósticos para *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* de acordo com Fowlie (1972)

Caráter diagnóstico	<i>Cattleya coccinea</i>	<i>Cattleya mantiqueirae</i>
Pseudobulbos	Cilíndricos	Robustos, arredondados
Folhas	Estreitas e eretas com nervura central e bordas com pigmentação vermelha	Ovais e curvadas, sem pigmentação vermelha na nervura central e nas bordas
Pétalas	Arredondadas com pontas redondas	Pontudas, compridas e mais estreitas
Época de floração	março-abril, julho-setembro	janeiro-fevereiro, setembro-outubro
Hábitat	Serra do Mar e montanhas do Espírito Santo	Serra da Mantiqueira

A época de floração é outro aspecto questionável, pois segundo Withner (1990) *C. mantiqueirae* apresenta seu pico de floração nos meses de janeiro e fevereiro, ocorrendo uma floração secundária nos meses de setembro e outubro, enquanto que *C. coccinea* apresenta três picos de floração, sendo o principal nos meses de agosto e setembro, com floração secundária em março e abril, com o último pico ocorrendo no mês de julho e nunca florescem em meados do verão (FOWLIE, 1987). Contudo, observações realizadas em campo e em material cultivado (S. Koehler e colaboradores, observação pessoal), indicaram variações no período considerado originalmente para distinção entre as duas espécies, sugerindo que não há um isolamento temporal de floração entre *C. coccinea* e *C. mantiqueirae*. Além disso, Fowlie (1968) não cita material testemunho além do tipo que justifique as decisões taxonômicas tomadas. É possível que tal decisão tenha sido baseada em um número limitado de indivíduos e populações com distribuição geográfica restrita.

2.4 Família Orchidaceae e a genética da Conservação

2.4.1 Implicações de estudos filogenéticos para a conservação de orquídeas

As orquídeas representam uma das maiores famílias de plantas com flores, aproximadamente 10% de todas as angiospermas (ROBERTS E DIXON, 2008) e talvez melhor do que qualquer outra família, as orquídeas apresentam as especializações florais mais extremas

que são possíveis de se observar na natureza comparadas com outras plantas (FAY E CHASE, 2009). Como resultado dessa exuberância, essas plantas têm fascinado grandes nomes da ciência botânica desde tempos remotos, incluindo Lineu e Darwin, mas em contrapartida o tamanho da família tem sido historicamente um obstáculo para seu estudo (FAY E CHASE, 2009). Especificamente, a falta de informações detalhadas sobre as relações filogenéticas dentro da família dificultaram a formulação explícita de hipóteses de evolução para um grupo tão grande (SWARTS E DIXON, 2009).

Outros fatores agravantes que estão sujeitas as populações naturais de orquídeas, é que elas sofrem basicamente os mesmos grandes riscos que enfrentam todas as demais espécies de plantas, tais como a coleta indiscriminada, destruição ou fragmentação de habitat, ruptura nas conexões ecológicas (i.e. com insetos polinizadores e associação com micorrizas), alteração das condições abióticas (i.e. solos e hidrologia), ervas daninhas e pragas que provocam doenças (LIGHT et al., 2003). Além disso, os impactos das mudanças climáticas, embora ainda não totalmente compreendidos sobre essas espécies de plantas, também podem ter consequências desfavoráveis para muitas orquídeas em seu habitat degradado não só com a seca, mas também pelo fogo e eventos climáticos extremos (LIGHT; KOOPOWITZ; MARCHANT, 2003).

A classificação da família Orchidaceae sofreu uma série de mudanças significativas durante a última década devido a estudos filogenéticos moleculares que examinaram as relações em todos os níveis taxonômicos na família. Hoje, 850 gêneros (CHASE, 2003) e 25.000 espécies (CAMERON et al., 1999; CHASE, 2005) da família Orchidaceae estão organizados em cinco subfamílias, sendo as duas maiores Epidendroideae e Orchidoideae que são divididos em 19 tribos e 43 subtribos (CAMERON, 2010) .

A questão de como seriam os projetos de conservação na família Orchidaceae é um problema complexo, mas uma ciência dinâmica como a Sistemática que inclui a Taxonomia (descrição e classificação de espécies) e a Filogenia (que reconstrói hipóteses das relações evolutivas) tem um inegável papel a desempenhar na área da genética da conservação (CAMERON, 2010). Entre as muitas maneiras que árvores filogenéticas podem ajudar os pesquisadores na definição de prioridades de conservação são de: 1) guiar taxonomistas na revisão de classificações de grupos de espécies, o que é essencial para a criação de listas, monografias e inventários sobre a flora; 2) determinar a existência ou não de um táxon, ou seja, delimitar os complexos de espécies, e que seja estabelecido se trata-se na verdade de uma espécie, ou de uma

sub-espécie; 3) descrever espécies raras ou crípticas que merecem reconhecimento e proteção; 4) identificar espécies que podem ser de utilidade agrônômica; 5) identificar as espécies que podem ter particularmente, importante valor científico para um melhor entendimento da biologia das plantas (CAMERON, 2010).

Neste contexto, a série de livros *Genera Orchidacearum* (PRIDGEON et al., 1999, 2001, 2003, 2005 e 2009), têm publicado estudos de todos os aspectos da biologia das orquídeas, fornecendo informações filogenéticas e resumos de pesquisas anteriores, como base para permitir ainda um estudo mais aprofundado. A série também define claramente onde existem lacunas no conhecimento, estimulando novos estudos focados em preencher estas lacunas. Mesmo com a riqueza de informações filogenéticas disponíveis, há ainda muitos aspectos da taxonomia de alguns grupos de orquídeas que estão sendo debatidas (FAY; CHASE, 2009).

Uma das premissas da genética da conservação é que não se pode proteger o que não se conhece, portanto é essencial o estabelecimento do *status* taxonômico dos organismos de acordo com a maior diversidade de caracteres possível (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004). Considerando como exemplo da importância de estudos nessa área, Cameron (2005a) estudou a taxonomia de espécies de orquídeas dentro dos gêneros *Liparis* e *Malaxis* (tribo Malaxideae, subfamília Epidendroideae). Tradicionalmente estes dois gêneros foram diagnosticados com base na ausência/presença de flores ressupinadas (voltadas para baixo) e na forma da coluna. Cameron (2005a) utilizou sequências de DNA nuclear da região ITS e de regiões do gene *matK* de plastídios para reconstruir as relações filogenéticas entre espécies destes dois gêneros. Os resultados sugerem que a atual divisão de gêneros é artificial, pois as espécies de hábito terrestre e epifítico evoluíram a partir de ancestrais mais recentes distintos e que a morfologia da folha parece ser um melhor indicador da história evolutiva do grupo do que as flores. As implicações deste estudo é que deverão ser adotados novos gêneros de modo que a nova classificação reflita a história evolutiva deste grupo.

Outro estudo sobre as relações filogenéticas foi realizado por Chase et al., (2009) dentro da subtribo Oncidiinae que inclui um dos maiores e mais populares gêneros de orquídeas brasileiras chamado de *Oncidium*, a partir do sequenciamento de regiões ITS de DNA nuclear, juntamente com o sequenciamento de regiões do éxon *matK*, éxon *ycf1*, mais o espaçador intergênico *psbA-trnH* de DNA de plastídios. Os autores concluíram que o gênero *Oncidium* não era monofilético e que a maioria das espécies brasileiras desse gênero não compartilhavam o

mesmo ancestral comum da espécie tipo, *O. altissimum* que foi descrito no Caribe. Outro aspecto discutido foi que a semelhança morfológica entre as muitas espécies desse gênero e que levou os taxonomistas a agregar todas as espécies no gênero *Oncidium* seria possivelmente a consequência da convergência adaptativa causada pela preferência dos agentes polinizadores. Os autores então decidiram agrupar as espécies brasileiras em um outro gênero chamado *Gomesa*.

Reconstruções filogenéticas têm um papel potencialmente importante a desempenhar na conservação de orquídeas, ajudando no reconhecimento e diagnóstico formal de espécies raras, negligenciadas e/ou espécies crípticas que necessitam ser protegidas. Em outras palavras, estudos sobre a filogenia de um grupo de espécies pode auxiliar na descoberta de uma maior diversidade de plantas, por exemplo, Brown; Dueck; Cameron (2008) publicaram a descoberta de uma nova espécie de *Spiranthes* na América do Norte ocidental, baseados no seqüenciamento de DNA nuclear e de plastídios. Os autores concluíram que indivíduos dos Estados da Califórnia e Oregon (EUA) originalmente descritos como *S. romanzoffiana* são geneticamente distintos de todas as outras amostras de indivíduos da espécie. Há algum tempo alguns pesquisadores já chamavam a atenção para o fato de que essas populações apresentavam diferenças morfológicas comparadas com a espécie tipo do leste da América do Norte, e foi questionado a ocorrência de híbridos. Os dados genéticos não apóiam essa hipótese, mas confirmaram que eles compartilham uma ancestral comum imediato, e justificam o *status* de nova espécie. Após um estudo mais aprofundado destes indivíduos, ficou claro para os autores que as plantas não só diferem em aspectos genéticos, mas também na sua distribuição geográfica, na morfologia da raiz e da flor e aspectos da sua ecologia. A nova espécie, *S. stellata*, não é comum, e muito provavelmente merece uma investigação mais aprofundada por pesquisadores conservacionistas para que se possa determinar se a nova espécie merece ou não maior proteção (BROWN. DUECK; CAMERON, 2008).

Os sistematas podem também ajudar a orientar o processo de priorização de conservação, no caso de populações que apresentem híbridos e alopoliplóides, devido a importância desses fatores para os processos evolutivos, uma vez que a ocorrência desses fenômenos podem levar a especiação (VERECKEN; DAFNI; COZZOLINO, 2010). Por exemplo, Meyer; Cameron (2009) realizaram um estudo a respeito do *status* taxonômico de *Dracula aphrodes*, uma espécie rara de orquídea que foi descrita em 1989 a partir de uma única localidade, na Colômbia. Eles reconstruíram a filogenia de *Dracula*, utilizando uma combinação de seqüenciamento da região ITS de DNA ribossomal nuclear e do gene *matK* de plastídios, mas constataram que quando

utilizavam apenas os dados de sequenciamento de DNA nuclear o resultado da árvore filogenética era diferente do resultado do DNA de plastídios. Então os pesquisadores cogitaram a hipótese de que *D. aphrodes* pudesse ser híbrido primário. Sendo sugerido pelo pesquisador Gary Meyer que *D. ventriculosa* seria o doador de pólen, portanto o parental paterno de *D. aphrodes*, enquanto *D. insolita* seria o parental materno. As três possíveis espécies *Dracula* crescem em simpatria na localidade conhecida apenas por abrigar *D. aphrodes*. Portanto ao elaborar programas de conservação para a rara *D. aphrodes* ou outras espécies de orquídeas, os pesquisadores devem agir com cautela e considerar o *status* taxonômico e biológico desse táxon. Infelizmente, Orchidaceae foram submetidos a excessiva inflação taxonômicas devido a sua variabilidade morfológica e carisma que despertam em amadores, simpatizantes e colecionadores de orquídeas que não possuem embasamento científico, segundo Pillon; Chase (2007) que argumentam que esse processo causa muitos problemas para a área da conservação.

Outra contribuição de estudos filogenéticos, é que eles podem ser usados para reconhecer ou mesmo prever as espécies que podem ser de valor econômico e/ou valor medicinal. O gênero da orquídea *Vanilla* fornece um exemplo desse aspecto. Há cerca de 100 espécies de *Vanilla* distribuídos em todo o mundo, sendo apenas uma, a *V. planifolia* de valor agrônomo, pois serve de fonte natural para a fabricação do sabor e aroma de baunilha (CAMERON, 2005b). Outras duas espécies a *V. tahitensis* e *V. pompona*, também são cultivadas por causa de seus frutos aromáticos, mas em menor escala. A maioria monoculturas de baunilha são de plantas individuais que estão sendo propagadas como estacas e são provenientes de uma ou poucas matrizes. Não há um programa de criação e coordenação de bancos de germoplasma de baunilha, a fim de aumentar a variabilidade genética de modo minimizar perda da cultura no caso de ocorrência de agentes patogênicos. Usando sequências genéticas para reconstruir a filogenia da baunilha, Cameron (2005b) demonstrou que todas as espécies do gênero conhecidas por produzir frutos aromáticos do qualidade variável são membros do mesmo clado, um grupo neotropical de espécies de *Vanilla*. Do ponto de vista econômico, poderá ser mais adequado conservar espécies neste clado, como um primeiro passo para a melhoria na conservação das espécies cultiváveis. Alternativamente, se houver interesse em melhorar a resistência a doenças em *V. planifolia*, pode ser aconselhável trabalhar com parentes mais distantes, pertencentes a outro clado, pois parentes próximos podem compartilhar a susceptibilidade do mesmo patógeno segundo Cameron (2005b), ou seja a árvore

filogenética e o conhecimento das relações interespecíficas permite aos conservacionistas poder escolher a melhor alternativa.

A respeito do valor científico de espécies, é importante ressaltar que há um número de espécies de orquídeas que podem ser de pouco interesse para horticultores, sem valor econômico reconhecido e sem nenhum valor ornamental, mas estas podem ser de grande valia para os cientistas e com condições de fornecer pistas sobre a evolução da família Orchidaceae (CAMERON, 2010). Fazendo-se uma analogia pode-se pensar nestas espécies de orquídeas como o equivalente botânico do ornitorrinco, por exemplo as espécies *Clematepistephium smilacifolium* e *Eriaxis rigida* da Ilha do Pacífico da Nova Caledônia são gêneros irmãos estreitamente relacionados com a espécie de *Epistephium* da América do Sul América. Sua posição entre os ramos da *Vanilloideae* tem o potencial de fornecer uma pista sobre a origem antiga de orquídeas no supercontinente Gondwana a mais de 90 milhões de anos atrás. Da mesma forma, a presença de espécies como *Pogonia japonica* e *P. minor* no leste da Ásia, assim como *P. ophioglossoides* na América do Norte, ajudam a elaborar hipóteses de como deve ter sido a flora contínua entre estes dois continentes, antes dos eventos de glaciação do Pleistoceno. A filogeografia representa um papel fundamental neste tipo de estudo. Portanto nem todas as orquídeas são iguais aos olhos dos evolucionistas, pois caso tenham que escolher entre proteger uma montanha contendo 20 espécies de *Bulbophyllum* que é um gênero contendo aproximadamente 1.800 espécies conhecidas, ou outra montanha, que abriga a espécie *Clematepistephium smilacifolium* como única espécie de orquídea, este pesquisador provavelmente votaria em favor da segunda espécie considerando o seu valor particular para a ciência. Assim segundo Cameron (2010) nem sempre a quantidade de espécies é a prioridade quando o assunto é a conservação de orquídeas.

Outro importante exemplo de espécies de orquídeas que tem valor científico para um melhor entendimento dos processos evolutivos em plantas é o estudo de Pinheiro et al. (2010). Os autores testaram a hipótese de fluxo gênico entre as espécies com grau de poliploidia diferentes no gênero *Epidendrum* entre as espécies *Epidendrum fulgens* e *E. puniceoluteum* que ocorrem no litoral brasileiro. Estudos como esse não são comuns pois essas espécies são consideradas isoladas reprodutivamente por causa das barreiras pós-zigóticas. Foram analisadas populações naturais alopátricas e simpátricas com a utilização de microssatélites de DNA de plastídios e de DNA nuclear. Todas as populações simpátricas analisadas apresentaram zonas híbridas e introgressão,

além disso o estudo sugere que a hibridização e introgressão são processos evolutivos que desempenham um importante papel na diversificação do gênero.

A complexidade de um programa de conservação demanda uma organizada infraestrutura e investimento intelectual. Definir prioridades de conservação para orquídeas dependerá em grande parte, do acesso a um conjunto de informações como, taxonomia, biologia, ecologia e filogenia, entre outras sobre orquídeas (SEATON et al, 2010). Neste contexto, surge a importância dos bancos de germoplasma como os Jardins Botânicos e Orquidários em institutos de pesquisa, esse modelo (para cultivo e de herbário) com bases de dados, fornecem um excelente recurso para conservação e planejamento, tais como análises de distribuição de espécies, prioridade de conservação em locais mais ameaçados e compreensão *status* da espécie. O valor dessas coleções depende da acessibilidade aos dados com digitalização e acesso à Internet, fornecendo ferramentas poderosas que permitem a captação precisa e oportuna e divulgação de informações segundo Seaton et al (2010).

Como é de conhecimento, o declínio das espécies de orquídeas ocorre em um ritmo acelerado e não há recursos suficientes e capacidade técnica para reverter a perda de habitat em particular nas zonas críticas em nível mundial, portanto os Jardins Botânicos e Orquidários tem um importante papel a desempenhar na área da conservação como por exemplo para fornecer oportunidades de abrigo e proteção de espécies ameaçadas, bem como de desenvolver e adaptar condições tecnológicas para restaurar as espécies em ambiente natural (SWARTS E DIXON, 2009).

2.4.2 Implicações de estudos de diversidade genética para a conservação de orquídeas

A Genética Evolutiva que inclui a Genética de Populações é uma disciplina central no estudo dos processos evolutivos, que utiliza tanto os métodos da Genética molecular, como os da Genética clássica, para compreender a origem da variação por mutação e recombinação. Especificamente descreve os padrões de variação genética dentro e entre populações e espécies, e usa tanto estudos empíricos, como a teoria matemática para descobrir como essa variação é influenciada por processos tais como deriva genética, fluxo gênico e seleção natural (FUTUYMA, 2005).

Estudos sobre a genética de espécies ameaçadas de extinção são necessários para estabelecer planos de gestão para conservar a biodiversidade (AVILA-DIAZ; OYAMA, 2007). A manutenção da diversidade genética dentro e entre as populações de espécies é um assunto crítico para um programa de conservação a longo prazo (FUTUYMA, 2005). Em teoria, um alto nível de diversidade genética em populações de determinada espécie permite uma melhor adaptação às mudanças ambientais e determina a sua capacidade evolutiva (ALLENDORF; LUIKART, 2007). Estudos teóricos e de campo mostraram que existe correlação positiva entre os níveis de diversidade genética e adequação ambiental em plantas e animais (SCHMIDT; JENSEN, 2000).

A família Orchidaceae representa um excelente exemplo de diversificação rápida de espécies, incluindo a radiação adaptativa, propiciando a investigação sobre uma grande quantidade processos ecológicos e evolutivos (DRESSLER, 1993; TREMBLAY et al., 2005). Neste contexto, a evolução da morfologia floral, a dinâmica das interações planta-polinizador, os efeitos da fragmentação de habitat sobre a diversidade genética das espécies, bem como a eficácia do fluxo gênico em condições naturais são alguns dos pontos relevantes destacados em pesquisas relacionadas às espécies de orquídeas (TREMBLAY; ACKERMAN, 2001; TRAPNELL; HAMRICK, 2005; TREMBLAY et al., 2005).

Entre os estudos sobre a diversidade genética da família Orchidaceae destaca-se o de Sun; Wong, (2001) que utilizaram marcadores moleculares RAPD em populações naturais. O estudo considerou três espécies; *Zeuxine gracilis*, de reprodução alógama; *Zeuxine strateumatica*, apomítica; e *Eulophia sinensis*, também alógama. Os autores constaram que as espécies de fecundação cruzada apresentaram maior diversidade genética se comparadas com a espécie apomítica. Em outro exemplo Wallace, (2004) com a utilização de marcadores ISSR estudou as espécies *Platanthera huronensis*, que é alógama e alopoliplóide, e seus dois progenitores diplóides *Platanthera aquilonis*, espécie autógama e *Platanthera dilatata* de reprodução alógama. A autora constatou que o menor índice de diversidade genética estava presente nas populações da espécie autógama *P. dilatata*, enquanto que as duas espécies alógamas apresentaram níveis mais altos e similares.

Outro aspecto importante a ser destacado em estudos de diversidade genética é a utilização não só de marcadores moleculares de DNA nuclear como os AFLP, RAPD, SSR e ISSR, mas também de sequenciamento de regiões de plastídios como o íntron *rps16*, o espaçador intergênico *accD-psaI* e o complexo de microssatélites *trnL-trnF*, frequentemente usados em estudos

filogenéticos. Fay; Chase, (2009) estudaram o padrão de diversidade genética e de fluxo gênico de populações naturais *Cypripedium calceolus* uma espécie de orquídea européia, mas muito rara no Reino Unido. Apesar desses dados serem menos informativos quando comparados com DNA nuclear, os plastídios representam uma opção satisfatória para estudar espécies com genomas grandes como o de *C. calceolus*, que é poliplóide, pois estudos prévios concluíram que os marcadores AFLP quando são utilizados em espécies que apresentam grande genoma, os resultados dos níveis de variação genética podem ser subestimados (FAY COWAN; LEITCH, 2005). Os marcadores microssatélites nucleares, da mesma forma, têm-se mostrado de difícil aplicação para os organismos com nível de poliploidia elevada (GARNER, 2002).

A destruição, modificação e fragmentação de florestas naturais, bem como a extração ilegal de orquídeas de populações naturais, tiveram uma forte influência na extinção de muitas espécies em várias regiões de todo o mundo (AVILA-DIAZ; OYAMA, 2007). Na verdade, a família Orchidaceae é um dos melhores exemplos em que as espécies foram levadas à extinção como resultado das atividades antrópicas. Por isso, nos últimos anos, tem havido uma maior ênfase em estudos de diversidade genética para desenvolver estratégias para a conservação de espécies de orquídeas (AVILA-DIAZ; OYAMA, 2007). Estes estudos têm sido úteis para resolver incertezas taxonômicas; para selecionar populações de espécies selvagens candidatas para ser dada prioridade a conservação; propor outras estratégias de manutenção e conservação *in situ* e *ex situ* (SHARMA; JONES; FRENCH, 2003).

Apesar das orquídeas epifíticas representarem aproximadamente 70% de todas as espécies existentes da família (DRESSLER, 1993), a maioria dos estudos genéticos em orquídeas se concentram em espécies terrestres (ALCANTARA; SEMIR; SOLFERINI, 2006; AVILA-DIAZ; OYAMA, 2007). Entre as possíveis razões pode-se citar a dificuldades no acesso à copa das árvores e a estrutura metapopulacional de plantas de dossel (TRAPNELL; HAMRICK, 2004, 2005). Outra razão seria a escassez de pesquisadores trabalhando em regiões tropicais, que constituem as áreas mais diversas em espécies de orquídeas do planeta e onde se concentram a maioria de espécies com hábito epifítico (CARVALHO et al., 2005). Espécies de orquídeas epifíticas podem ter um padrão diferente da estrutura genética se comparadas com as terrestres devido às características ecológicas particulares desse habitat. Os estudos em orquídeas epifitas têm mostrado que estas plantas apresentam em geral de alta diversidade genética e estruturação populacional. Consequentemente, uma alta diversidade genética pode ser uma vantagem

adaptativa para as plantas epífitas que vivem nesse habitat descontínuo e mutável (ÁVILA-DIAZ; OYAMA, 2007).

Dentre os vários estudos que têm como objetivo a análise da distribuição da variabilidade genética em populações de orquídeas destacam-se: Alcântara; Semir; Solferini, (2006) que estudaram *Oncidium hookeri* que é uma espécie neotropical de Orchidaceae epífitas encontradas na Mata Atlântica brasileira, no topo montanhas da Serra da Mantiqueira. A diversidade genética de *O. hookeri* foi estudada a partir de dados de aloenzimas, entre e dentro de seis populações localizadas nos remanescentes de Mata Atlântica, incluindo as estimativas de taxas de fluxo gênico entre as populações e a ocorrência de gargalos recentes, a fim de inferir o grau de isolamento das populações. Os autores detectaram um déficit de heterozigotos que parece ser causada pelo comportamento dos polinizadores, as baixas frequências de alelos de vários loci diferentes podem ser mantidas devido à propagação clonal. Apesar da natureza estocástica do vento dispersão de sementes a longas distâncias, este processo pode promover um fluxo gênico efetivo entre populações, evitando assim a especiação.

Outro trabalho que merece destaque foi o de Ávila-Díaz; Oyama, (2007) que estudaram outra espécie de orquídea epífita de valor ornamental chamada *Laelia speciosa*, que ocorre no México, os autores constataram baixos níveis de diversidade genética entre as populações, porém foi detectada uma correlação significativa entre distância geográfica e genética entre as populações com a utilização do teste de Mantel (1967). Além disso, populações localizadas em altitudes equivalentes da montanha eram geneticamente mais similares. Alelos raros foram encontrados e os autores sugerem que a gestão de recursos naturais nessa região de ocorrência da espécie deve ser feita de forma adequada para a proteção e manutenção da diversidade genética. Em caso de programas de reintrodução, seria necessário a utilização de indivíduos propagados a partir de sementes provenientes de populações próximas para garantir a maior diversidade possível.

Com a utilização de marcadores moleculares ISSR, George; Sharma; Yadon, (2009), realizaram um estudo com a orquídea *Piperia yadonnii* na Califórnia (Estados Unidos) e constataram que 99% dos locos foram polimórficos dentro de cada população e a maioria dos locos são compartilhados entre populações. Concluíram também que 40% da variação total foi detectada entre populações e 60% dentro das mesmas. Os autores argumentaram que a alta diversidade genética dentro das populações se deve à fragmentação de hábitat e ao fluxo gênico

limitado. Cada população apresentou alelos exclusivos indicando que devem ser protegidas para preservar a diversidade global da espécie e que algumas dessas populações são pequenas demais para ser manter naturalmente e apresentaram modestos índices de diversidade entre indivíduos da mesma população, portanto devem ser elaborados planos de expansão de habitats, juntamente com estratégias adicionais para a conservação dessa espécie de orquídea.

Em seu livro “A origem das espécies de orquídeas” Darwin argumentou que a grande diversidade e incrível beleza dessas plantas poderia ser produto de um fenômeno que é impulsionado por altos níveis de variabilidade e complexidade, que cria situações que geram níveis de especiação cada vez maiores, como por exemplo os casos extremos de *Angraecum sesquipedale* e o do gênero *Ophrys*. Portanto estudos sobre a diversidade genética são essenciais para que se possa identificar genótipos endêmicos e a importância evolutiva dessas espécies de plantas. Além disso, os projetos multidisciplinares que englobam estudos biológicos (i.e aspectos ecológicos, biogeográficos, taxonômicos e filogenéticos), a conscientização ambiental das comunidades locais, além de ações imediatas para preservar o habitat dessas plantas em todo seu alcance geográfico, são indispensáveis para se alcançar uma gestão sustentável das espécies de orquídeas.

2.5 Análises estatísticas

2.5.1 Neighbor-joining

O método de Neighbor-joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) é utilizado para reconstrução de árvores filogenéticas a partir de medidas de distâncias genéticas, de acordo com o princípio da evolução mínima proposto por Cavalli-Sforza; Edwards (1967). Nesse método, os dados brutos são fornecidos como uma matriz de distância e a árvore inicial é uma árvore-estrela, ou seja sem raiz. Além de fornecer uma topologia para a árvore sem raiz, o método também proporciona o cálculo do comprimento dos ramos da árvore resultante usando, por exemplo, o critério de Fitch-margoliash (1967).

Neste método, a matriz de distância é ajustada para as diferenças nas taxas de evolução de cada táxon (ramo). A árvore-estrela é construída de forma em que a separação entre cada par

de nós é ajustado em função da sua divergência média de todos os outros nós. Quando dois nós estão ligados, o nó ancestral comum é adicionado à árvore e os nós terminais com os seus respectivos ramos são retirados da árvore. Este processo de “poda” converte o ancestral comum recém-adicionado, em um nó terminal e a árvore tem seu tamanho reduzido. Em cada etapa do processo, dois nós terminais são substituídos por um novo nó. O processo é concluído quando dois nós permanecem separados por um único ramo (SAITOU; NEI, 1987).

Para um número N de terminais, deve ser calculada a distância entre diferentes pares de indivíduos para permitir a aplicação do método empregando-se a seguinte fórmula: $N(N-1)/2$, que representa o número de elementos do triângulo superior (sem a diagonal), de uma matriz quadrada $N \times N$. Além disso, alguns procedimentos são indispensáveis ao longo do processo de junção sucessiva de nós: 1. O critério de escolha dos dois nós da árvore-estrela que sofrerão a junção, serão aqueles que levarem a nova árvore-estrela a ter o valor mínimo do somatório do comprimento de todos os ramos, considerando-se todas as junções possíveis. 2. Cálculo do comprimento do ramo do nó interno da árvore-estrela. 3. Cálculo do comprimento do ramo dos dois nós escolhidos para sofrer junção até o novo nó da árvore-estrela, que é seu ancestral comum. 4. Cálculo da nova matriz de distâncias após a junção, com dimensão $(N-1) \times (N-1)$.

Neighbor-joining é um método mais vantajoso do que o UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (SOKAL; MICHENER, 1958; SNEATH; SOKAL, 1973), pois corrige o pressuposto, frequentemente inválido, de que uma mesma taxa de evolução se aplica a todos os ramos de uma filogenia. O método de neighbor-joining apresenta os melhores resultados em simulações e é computacionalmente o mais eficiente algoritmo de distancias, por isso é atualmente o mais utilizado na construção de árvores filogenéticas (ELIAS; LARGEGRÉN, 2009).

2.5.2 Máxima parcimônia

A Máxima parcimônia (MP) é um método de identificação da árvore filogenética potencial onde a hipótese mais simples deve ser escolhida dentre todas as hipóteses possíveis de reconstrução filogenética, ou seja a árvore filogenética que apresentar o menor número total de eventos evolutivos para explicar a sequência de dados observados será a árvore mais

parcimoniosa e portanto a escolhida. As árvores geradas por essa análise são avaliadas utilizando-se um algoritmo simples para determinar quantos “passos” ou transições evolutivas são necessárias para explicar a distribuição de cada caráter. A etapa é em essência, uma mudança de um estado de caráter para outro, embora a ordem de transição em alguns caracteres requerem mais de uma etapa.

Entretanto o método apresenta algumas limitações, pois o número de árvores não enraizadas que necessitam ser analisadas para que se possa encontrar, entre todas topologias possíveis a árvore mais adequada, aumenta rapidamente como o número de dados. Além disso um determinado conjunto de dados pode gerar mais de uma árvore igualmente parcimoniosa. Outro problema é que o método pode ser influenciado pelo alto nível de homoplasias (origens independentes do mesmo estado de caráter).

Existem vários algoritmos baseados no princípio da Parcimônia Máxima, como a "parcimônia de Fitch (FITCH, 1971) e Wagner" (KLUGE; FARRIS, 1969), a "parcimônia de Dollo" (FELSENSTEIN, 1985), a "parcimônia de Camin-Sokal" (CARMIN, SOKAL, 1965). Todos eles baseiam-se em um critério de otimização específico, mas, no entanto, não utilizam modelos evolutivos de substituição de nucleotídeos explícitos. O algoritmo de Dollo fundamenta-se na Lei de Dollo (1893) que postula que uma vez que uma estrutura complexa é atingida, não será novamente atingida da mesma forma. Ou seja, as apomorfias só são atingidas uma única vez e todas as homoplasias devem ser atribuídas à perdas secundárias (reversões). Assim como a otimização de Carmin-Sokal, esse método assume a polaridade a priori, assim a transformação só ocorre em uma direção. Esse cenário desfavorece a convergência evolutiva. Esse método é mais aplicado em uma versão que contém um modelo de perda e ganho de sítios de restrição de DNA, onde há baixa probabilidade de ganho e alta probabilidade de perda de um sítio.

2.5.3 Análise de variância molecular (AMOVA)

Análise de variância molecular (AMOVA) é um método utilizado para descrever a estrutura genética de populações, ou seja esse método busca estimar diferenças na estrutura genética de populações de forma hierárquica, diretamente a partir de dados moleculares e teste de hipóteses sobre tal diferenciação. Esse tipo de análise surgiu como uma alternativa para dados

obtidos a partir de marcadores moleculares dominantes, ou ainda pode ser utilizada para análises de dados de seqüenciamento de DNA nuclear e de plastídios, como também árvores filogenéticas com base em tais dados moleculares podem ser analisadas por este método (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

Análise de Variância Molecular, que foi denominada de estatística Φ é análoga a estatística F de Wright (WRIGHT, 1965). A estatística Φ reflete uma hipótese sobre a diferenciação, em que o nível hierárquico de uma população, por exemplo entre demes (subpopulação) na população, pode ser tratada como uma hipótese sobre a diferenciação entre a população e seus demes componentes. Estas hipóteses podem ser testadas usando a distribuição nula de componentes de variância: se a variância da sub-populações não difere significativamente da distribuição nula da variação da população, a hipótese de que as sub-populações se diferenciam da população maior seria rejeitada (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

Nesta análise as somas de quadrados (SQ) utilizados na análise de variância (σ^2) são escritos na forma de soma de quadrados das diferenças entres pares de observações. Com isso é gerada uma análise de variância molecular hierárquica que ser origina diretamente da matriz da distância quadrada de todos os pares de haplótipos. Os haplótipos devem ser escolhidos de forma independente e ao acaso. Devido à deriva genética, o haplótipo não deve ser considerado como representante da variação entre todo genoma. Portanto, é importante que os dados sejam derivados de um número adequado de marcadores ou pares de base. Os efeitos da seleção também não são completamente considerados, pois se as subpopulações estão sob diferentes pressões seletivas, a seleção poderá ter efeitos muito diferentes sobre os alelos e sobre as combinações genótípicas. Portanto, segundo Excoffier; Smouse; Quattro (1992) os resultados obtidos deverão ser analisados com devida cautela.

As equações das estatísticas Φ podem ser consideradas da seguinte maneira:

$$\Phi_{SC} = \sigma_b^2 / \sigma_b^2 + \sigma_c^2$$

$$\Phi_{CT} = \sigma_a^2 / \sigma^2$$

$$\Phi_{ST} = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 / \sigma^2$$

Considerando: a = efeito de grupos, b = efeito de populações, c = efeito de haplótipos; onde: $\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2$; Φ_{SC} é a correlação da diversidade molecular entre haplótipos aleatórios dentro das populações, relativa aos pares de haplótipos aleatórios amostrados de uma

região; Φ_{CT} é a correlação entre haplótipos aleatórios dentro de cada grupo de populações, relativa à correlação de pares de haplótipos aleatórios amostrados da espécie como um todo; Φ_{ST} é a correlação entre pares de haplótipos aleatórios dentro de populações, relativa aos pares de haplótipos aleatórios amostrados da espécie como um todo (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram realizadas coletas em seis localidades na região Sudeste do Brasil, sendo três localizadas na formação geológica denominada de Serra do Mar (Nova Friburgo/RJ, Petrópolis/RJ e São José do Barreiro/SP) e as outras três na Serra da Mantiqueira (Lima Duarte/MG, Alto Caparaó/MG e Campos do Jordão/SP), por serem o habitat natural de *C. coccinea* e *C. mantiqueirae*. (Tabela 2) (Figura 7 e 8). Na coleta foram utilizadas uma ou duas folhas jovens e sadias de cada touceira ou indivíduo. Ao serem coletadas, as folhas foram armazenadas e transportadas em gel CTAB¹, que se mostrou como o método de coleta mais eficiente para este grupo - testes prévios indicaram que a sílica gel é inapropriada para preservação de DNA total

em orquídeas do gênero *Cattleya* (van den Berg, comunicação pessoal). Em seguida as amostras foram armazenadas a 4 °C.

Em cada localidade procurou-se coletar aproximadamente trinta indivíduos, mas esse número só foi obtido em duas: Petrópolis, RJ e Lima Duarte, MG enquanto que nas outras localidades a quantidade de indivíduos coletados variou de 23 a 27. Esse fato deve-se a fatores como: tamanho reduzido de todas as populações, associado ao difícil acesso a algumas localidades como a de Alto Caparaó/MG no Vale Encantado. A única exceção foi observada na localidade de Lima Duarte/MG.

A localidade de Alto Caparaó apresentou uma composição de espécies mista. No primeiro local, denominado Vale encantado, foram coletados apenas seis indivíduos, morfologicamente condizente com a circunscrição de *C. Mantiqueira*. Já no segundo local, Trilha da Cachoeira, foram coletados 18 indivíduos restantes que totalizam os 24 da localidade. Essa segunda subpopulação apresenta características morfológicas que condizem com a delimitação de *C. coccinea*. Devido aos aspectos descritos, a localidade de Alto Caparaó foi dividida em duas subpopulações para as análises de genética de populações: Alto Caparaó 1 (correspondente ao Vale Encantado) e Alto Caparaó 2 (correspondente a Trilha da Cachoeira).

¹3 g de Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB); 35 g NaCl; 70 ml água destilada.

Tabela 2 - Localidades de coleta (estados, municípios e nome do local); espécies descritas para as localidades; coordenadas geográficas e altitude máxima dos locais de coleta. **n**: número de indivíduos coletados

Localidades	Espécie	n	Coordenadas	Coordenadas	Altitude
Petrópolis/RJ -Fazenda do Facão	<i>C. coccinea</i>	30	S 22 26'39''	W 43 13'41''	1200 m
Nova Friburgo/RJ -Morro Cumieira	<i>C. coccinea</i>	23	S 22 23'19''	W 42 29'06''	1300 m
S. José do Barreiro/SP-Tira Chapéu	<i>C. coccinea</i>	27	S 22 46'30''	W 44 39'63''	2060 m
Campos do Jordão/SP-Estrada	<i>C. mantiqueirae</i>	24	S 22 42'27''	W 45 28'04''	1874 m
Alto Caparaó/MG-Vale Encantado	<i>C. mantiqueirae</i>	6	S 20 24'38''	W 45 28'04''	1982 m
Alto Caparaó/MG-Trilha Cachoeira	<i>C. coccinea</i>	18	S 20 24'23''	W 41 50'03''	1863 m
Lima Duarte/MG- Mata/área aberta	<i>C. mantiqueirae</i>	30	S 21 42' 50"	W 43 50' 50''	1360 m

Figura 7 - Unidades de Relevo de parte da região sudeste do Brasil

Fonte: Instituto Brasileira de Geografia e Estatística – IBGE.

Serras

- Serras dos Rios Paraguai/Guaiporé (34)
- Serra do Espinhaço e Chapada da Diamantina (35)
- Serras da Canastra (36)
- Serra da Mantiqueira (37)
- Serra do Mar (38)
- Serras do Leste Catarinense (39)

Legenda:

- Depressões dos Rios Jequitinhonha/Doce e Paraíba do Sul (15)

Figura 5 - Mapa de relevo de parte da região sudeste do Brasil. A oeste a Serra da Mantiqueira, a leste a Serra do Mar e separando as serras, o Vale do Paraíba do Sul. 1-Petrópolis/RJ, 2-Nova Friburgo/RJ, 3-São José do Barreiro/SP, 4-Campos do Jordão/SP, 5-Alto Caparaó/MG, Lima Duarte/MG

Fonte: Free relief layers for Google maps.

3.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo modificado de Doyle; Doyle (1987), incluindo uma etapa prévia para remoção do excesso do gel CTAB (van den Berg, com. pess.). O excesso de gel presente nos fragmentos de tecido vegetal foi excluído com auxílio de papel toalha. Em seguida, os fragmentos foram macerados em 1 ml de tampão STE (Sacarose Tris-EDTA) gelado, que auxilia a retirada do cloreto de sódio contido no gel. O material macerado foi transferido para tubo 1,5 ml e em seguida centrifugado a velocidade de 4 mil rpm por 10 min. Após esse procedimento o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado em seguida 1 ml de CTAB 2% + PVP 1% (Polivinilpirrolidona) + 8 µl de β-mercaptoetanol e deixado no banho-seco a 60°C por 1 hora. Posteriormente foram adicionados 500 µl de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) gelado e, em seguida, centrifugadas por 5 min à velocidade de 13.000 rpm. Essa etapa foi

repetida e adicionado posteriormente 500 µl de isopropanol gelado e 30 µl de acetato de sódio 3 M, em seguida as amostras foram armazenadas em freezer onde permaneceram a -20°C por 12-72 horas. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em velocidade máxima (13.000 rpm). Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70% gelado por três vezes. Após a completa evaporação do etanol residual, o DNA foi ressuspendido adicionando-se 32 µl tampão TE 0,1 M EDTA.

O resultado da extração foi verificado em gel de agarose 1%. Posteriormente as amostras foram purificadas utilizando-se o kit Qiagen® QIA PCR Purification Kit e ressuspendidas em 100 µl de tampão EB (kit Qiagen®).

3.2 Seleção e otimização de iniciadores de ISSR

Primeiramente foram testados 20 iniciadores, obtidos a partir dos protocolos de Wolfe (2000) (Tabela 2). Nesse teste foram utilizados três indivíduos de cada uma das seis localidades de coleta de orquídeas, de forma a permitir a verificação da presença de polimorfismo, bem como a otimização das condições de amplificação. Para as otimizações das reações de PCR foram utilizados um coquetel contendo 10% (v/v) de tampão (Invitrogen™) constituído de 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1Mm DTT, estabilizadores, 50% (v/v) glicerol; 2,0 e 2,33 mM de MgCl₂ (Invitrogen™); 0,2 mM de dNTP (Ludwig Biotec); 1 -1,5µl (a 10 pmol) de cada iniciador; 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e 1 µl de DNA.

As reações foram realizadas no termociclador Multigene Thermal Cycller (Labnet International, Inc.), seguindo as seguintes condições de amplificação: 94°C/90 seg; 35 ciclos de 94°C/40 seg, 46 a 52°C/45 seg, 72°C/90 seg; 94°C/45 seg; 44°C/ 45 seg; 72°C/5 min. Os produtos resultantes da reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose com concentração de 2% em tampão TBE 1X, por 135 min a 90 V. Para auxiliar a análise das bandas serão utilizados 3µg do marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™). Adicionalmente foram utilizadas como controle amostras previamente amplificadas com sucesso, em que obteve-se um padrão de bandas robustas e inequívocas.

Tabela 3 - Iniciadores testados e suas respectivas sequências (Wolfe, 2000)

Nome do iniciador	Sequência (5' - 3')
AW3	[GT] ₆ -RG
BECKY	[CA] ₇ -YC
CHRIS	[CA] ₇ -YG
DAT	[GA] ₇ -RG
GOOFY	[GT] ₇ -YG
JOHN	[AG] ₇ -YC
MANNY	[CAC] ₄ -RC
MAO	[CTC] ₄ -RC
OMAR	[GAG] ₄ -RC
TERRY	[GTG] ₄ -RC
7	[CT] ₈ -RG
UBC 814	[CT] ₈ -TG
UBC 843	[CT] ₈ -RA
UBC 844	[CT] ₈ -RC
UBC 898	[CA] ₆ -RY
UBC 899	[CA] ₆ -RG
901	[GT] ₆ -YR
902	[GT] ₆ -AY
M1	CAA-[GA] ₅
M2	GGGC-[GA] ₈

O gel foi posteriormente fotografado sobre fonte de luz ultravioleta com auxílio do sistema de fotodocumentação Syngene (Synoptics Ltda). Para a análise estatística dos dados foram consideradas apenas as bandas robustas e inequívocas, as bandas que apresentarem baixa intensidade ou coalescentes com outras bandas serão descartadas. A análise das fotografias dos géis de agarose resultou em matrizes binárias indicando a presença e ausência de fragmentos de tamanhos distintos.

3.3 Análise de dados

Nesse estudo consideram-se espécies como linhagens evolutivamente isoladas uma das outras. Idealmente, sob esse conceito, métodos filogenéticos são os mais apropriados para delimitação de espécies. Entretanto, o conceito filogenético é limitante quando aplicado a eventos recentes de especiação (HUDSON ; COYNE 2002). Por esse motivo, foram adotados métodos filogenéticos e não-filogenéticos para delimitação de espécies com o intuito de obter a maior

quantidade de informações possível a respeito da interação das unidades taxonômicas delimitadas para esse estudo.

3.3.1 Análises filogenéticas

Nas análises filogenéticas foram considerados dois critérios. Primeiramente foi realizada uma análise de distância, com auxílio do programa PAUPb10* (SWOFFORD, 2000), utilizando-se o algoritmo de *neighbor-joining* e considerando o coeficiente de Nei; Li (1979). A escolha deste coeficiente se deve às suas propriedades estatísticas que desconsidera as ausências de bandas como homólogas. Adicionalmente, foi realizada uma análise considerando o critério de máxima parcimônia (MP) de Dollo, no qual estados derivados ocorrem uma única vez, sendo eventos de evolução independente atribuídos a perdas secundárias (reversões). Para tal utilizou-se o programa PAUPb10* (SWOFFORD, 2000), considerando 10.000 réplicas de adição de sequências pelo algoritmo ‘stepwise’, salvando dez árvores/réplica e ‘branch swapping’.

Ambas as análises consideraram como grupo externo as espécies *Cattleya pumila* Hook., *Cattleya sincorana* Schltr., *Cattleya jongheana* Rchb.f., *Cattleya dayana* Rchb.f. van den Berg, selecionadas a partir da árvore filogenética do grupo *Cattleya* (VAN DEN BERG, 2008). A confiabilidade dos clados obtidos foi estimada com 1.000 pseudo-réplicas de ‘bootstrap’, com auxílio do programa PAUPb10*. Devido ao longo tempo de análise, para o critério de parcimônia foi necessário utilizar uma estratégia de busca mais simples (opção ‘fast stepwise addition’ do programa PAUPb10*). As categorias *bootstrap* considerados neste estudo foram: sem suporte (<50%), fraco (50-74%), moderado (75-84%), forte (85-100%) (WHITTEN; WILLIAMS; CHASE, 2000).

3.3.2 Análises de genética de populações

O índice de diversidade genética empregado foi o de Shannon-Wiener (*H*), este índice foi primeiramente proposto para medir a diversidade de espécies em estudos de ecologia, mas com o

advento das técnicas moleculares está sendo frequentemente utilizado para medir a diversidade genética dentro de uma população ou de populações.

O índice de Shannon-Wiener utiliza a expressão:

$$H = - \sum P_i \log_2 P_i$$

sendo P_i a frequência de uma dada banda.

Segundo Sun; Wong, (2001), este índice é adequado para análise de marcadores dominantes, podendo ser utilizado para comparações entre espécies e entre populações da mesma espécie. O programa computacional utilizado nessa análise foi POPGENE versão 1.31 (YEH et al., 1997) no qual, para dados de marcadores dominantes assume-se que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Segundo Nei (1973) o índice de diversidade genética estima a variabilidade genética com base na frequência esperada de indivíduos heterozigotos e no número de alelos que são mantidos para cada loco considerado, ou seja a heterozigosidade esperada (H_e). Ela reflete o polimorfismo de uma população, podendo ser expressa através da fórmula:

$$H_n = \sum N_{ab}$$

com $a \neq b$

N_{ab} = frequência de indivíduos heterozigotos observados na população

n = loco considerado.

Para a análise da diversidade genética dentro e entre populações de *Cattleya coccinea* e *C. mantiqueirae* foi utilizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). AMOVA é uma ferramenta utilizada para estimar a variabilidade genética dentro e entre populações a partir de dados moleculares e testar hipóteses sobre tais diferenciações, além de possibilitar inferências a respeito da estrutura genética de tais populações (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). Na análise de variância molecular as distâncias genéticas são tratadas como desvios da média de um grupo, onde os quadrados desses desvios são utilizados como variância, permitindo assim caracterizar a variação genética dentro e entre as populações amostradas (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). Para estas análise foi utilizado o programa computacional ARLEQUIN 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

4 RESULTADOS

4.1 Teste e seleção dos iniciadores de ISSR

Inicialmente, foram testados 20 iniciadores ISSR, sendo que 13 apresentaram resultados satisfatórios (Tabela 4), com um padrão de bandas polimórficas, nítidas e de fácil identificação (Figura 8). Para a construção da matriz das análises filogenéticas e de diversidade genética, foi considerada a presença/ausência de bandas robustas e inequívocas. As bandas que apresentaram baixa intensidade ou coalescentes com outras bandas foram excluídas.

A genotipagem foi efetuada manualmente através da comparação de padrões de bandas em gel. A matriz binária final resultante das análises de todos os géis de ISSR considerou 295 caracteres (ou locos), com o comprimento variando de 200 a 2000. Desse montante, 253 (85,76%) correspondem a bandas polimórficas (segundo Nei, (1987) são considerados polimórficos os locos nos quais a frequência do alelo mais comum foi menor ou igual a 95%) (Tabela 5). O número de indivíduos considerados foi de 173, sendo 15 referentes ao grupo externo das análises filogenéticas. Para as análises de genética de populações foram considerados apenas 158 indivíduos, referentes às populações de *C. coccinea* e *C. Mantiqueirae*.

Tabela 4 - Iniciadores otimizados com suas respectivas temperaturas de anelamento e concentração de MgCl₂

Iniciador	Sequência (5' - 3')	Temperatura otimizada (°C)	Concentração de MgCl ₂ (µl)
AW3	[GT] ₆ -RG	48°C	2,00
MANNY	[CAC] ₄ -RC	50°C	2,00
MAO	[CTC] ₄ -RC	47°C	2,00
OMAR	[GAG] ₄ -RC	51°C	2,00
TERRY	[GTG] ₄ -RC	52°C	2,00
UBC 899	[CA] ₆ -RG	50°C	2,00
GOOFY	[GT] ₇ -YG	50°C	2,33
7	[CT] ₈ -RG	48°C	2,33
UBC 814	[CT] ₈ -TG	50°C	2,33
UBC 843	[CT] ₈ -RA	50°C	2,66
UBC 844	[CT] ₈ -RC	50°C	2,33
901	[GT] ₆ -YR	52°C	2,33
DAT	[GA] ₇ -RG	50°C	2,66

Figura 8 - Padrão de bandas de marcadores ISSR amplificadas a partir da utilização do iniciador OMAR, para a localidade de Campos do Jordão/SP

4.2. Análises filogenéticas

Para a análise de Máxima Parcimônia, 275 caracteres mostraram-se potencialmente informativos. Foram obtidas 10 árvores igualmente parcimoniosas de comprimento igual a 3.902 passos. As árvores filogenéticas ótimas resultantes das análises de NJ e MP apresentam grande semelhança entre si (Figuras 9 e 10). Diferenças topológicas estão restritas às relações entre terminais de uma mesma população. Ambas as análises indicam que as espécies tradicionalmente reconhecidas como *Cattleya coccinea* e *C. mantiqueirae* não constituem grupos monofiléticos, assim como o complexo *C. coccinea* – *C. mantiqueirae*. Todas as populações de *C. coccinea* amostradas juntamente com as populações de *C. mantiqueirae* de Campos do Jordão/SP, e Alto Caparaó/MG, constituem um clado com valores de bootstrap 94% (NJ) e 50% (MP) (Figuras 9 e 10). Além disso, esse clado é indicado como irmão de *C. mantiqueirae* (população de Lima Duarte/MG) + *C. wittigiana* + *C. brevipedunculata* (valores de bootstrap 100% (NJ) e 70%, (MP)). Entretanto, cada uma das populações estudadas das espécies *Cattleya coccinea* e *C. mantiqueirae* e as espécies *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana* foram indicadas como grupos monofiléticos, como valores de bootstrap variando de alto a moderado (exceto pela população de Alto Caparaó, MG na análise de MP).

Figura 9 - Árvore de distância obtida com critério de *neighbor-joining* para populações do complexo *Cattleya coccinea* - *C. mantiqueirae*. Valores de *bootstrap* >50% estão indicados acima dos ramos. (A) População do Vale Encantado (Alto Caparaó/MG) (B) População da Trilha da Cachoeira (Alto Caparaó/MG)

Figura 10 - Uma das 10 árvores de máxima parcimônia obtidas para populações do complexo *Cattleya coccinea* - *C. mantiqueirae*. Valores de *bootstrap* >50% estão indicados acima dos ramos. (A) População do Vale Encantado (Alto Caparaó/MG) (B) População da Trilha da Cachoeira (Alto Caparaó/MG)

Os resultados também sugerem que a geomorfologia não é um componente importante na diversificação de linhagens do complexo *Cattleya coccinea* – *C. mantiqueirae*. Apenas as populações de Petrópolis/MG e Nova Friburgo/RJ, ambas localizadas na Serra do Mar e geograficamente mais próximas, são indicadas como irmãs (valores de *bootstrap* 82% (NJ) e 53% (MP)). As relações filogenéticas entre as populações restantes não correspondem aos padrões biogeográficos sugeridos por Fowlie (1972) para distinção das espécies *C. coccinea* e *C. mantiqueirae*. A população de Alto Caparaó/MG, localizada na Serra da Mantiqueira, aparece como clado irmão do clado Petrópolis/MG + Nova Friburgo/RJ, pertencente a Serra do Mar (valores de *bootstrap* 83% (NJ) e <50% (MP)). Adicionalmente, as populações de Campos do Jordão/SP e São José do Barreiro, SP, localizadas na Serra da Mantiqueira e Serra do Mar, respectivamente, constituem clados irmãos (88% (NJ) e 76% (MP)) (Figuras 9 e 10).

4.3. Análise de genética de populações

A porcentagem de locos polimórficos (P) para cada uma das populações foi bastante similar: Petrópolis/RJ (31,53%); Nova Friburgo/RJ (33,56%); São José do Barreiro/SP (28,47%); Campos do Jordão/SP (20,34%); Alto Caparaó/MG (40,68%) [Alto Caparaó 1 (27,81%); Alto Caparaó 2; (26,11%)] e Lima Duarte/MG (30,85%) (Tabela 4).

Os valores do Índice de Shannon (I) e de diversidade genética de Nei (H_e) mostraram-se baixos e também muito similares (Tabela 5): Petrópolis/RJ (I = 0,121; H_e = 0,077); Nova Friburgo/RJ (I = 0,132; H_e = 0,084); 0,099 para São José do Barreiro/SP (I = 0,099; H_e = 0,062); Campos do Jordão/SP (I = 0,089; H_e = 0,058); Alto Caparaó/MG (I = 0,178; H_e = 0,116) [Alto Caparaó 1 (I = 0,138; H_e = 0,091); Alto Caparaó 2 (I = 0,112; H_e = 0,072)] e Lima Duarte (I = 0,106; H_e = 0,065). (Tabela 4).

Tabela 5 - Análise genética de cada localidade (populações); **n**: número de indivíduos coletados; **I**: índice de Shannon; **H_e**: diversidade genética de Nei (1973) e **P**: porcentagem de locos polimórficos. Desvio padrão entre parênteses

Populações	n	I	H _e	P
Petrópolis/RJ	30	0,121 (0,221)	0,077 (0,152)	31,53
Nova Friburgo/RJ	23	0,132 (0,226)	0,084 (0,155)	33,56
São José do Barreiro/SP	27	0,099 (0,199)	0,062 (0,135)	28,47
Campos do Jordão/SP	24	0,089 (0,200)	0,058 (0,136)	20,34
Alto Caparaó/MG	24	0,178 (0,254)	0,116 (0,176)	40,68
Alto Caparaó/MG 1	6	0,138 (0,239)	0,091 (0,164)	27,81
Alto Caparaó/MG 2	18	0,112 (0,215)	0,072 (0,146)	26,11
Lima Duarte/MG	30	0,106 (0,194)	0,065 (0,131)	30,85
Total	158	0,313 (0,254)	0,201 (0,183)	85,76

A estrutura genética das populações foi medida pela análise de diversidade de genes em população subdivididas (NEI, 1973), sendo que o valor da heterozigosidade genética total (H_t) foi: 0,1938; o valor da heterozigosidade média dentro das populações (H_s) foi: 0,0724. O valor do coeficiente de diferenciação populacional (G_{st}) foi: 0,6262. Nas análises de variância molecular foi avaliado, primeiramente, a estrutura genética das localidades da Serra do Mar X localidades da Serra da Mantiqueira, uma vez que a delimitação de espécies no complexo *Cattleya coccinea* - *C. mantiqueirae* é baseada em parte no componente geomorfológico. A outra hipótese testada foram as relações de parentesco entre as populações obtidas nas análises filogenéticas: (1) Alto Caparaó/MG + Petrópolis/RJ + Nova Friburgo/RJ X Campos do Jordão/SP + São José do Barreiro/SP X Lima Duarte/MG.

A distinção entre populações da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira não é sustentada pela análise de variância molecular (Tabela 6). A variação entre grupos é muito baixa (0,50%), enquanto que a maior parte da variação (69,80%) é encontrada dentro dos grupos (Tabela 6).

A análise de variância molecular para segunda hipótese de agrupamento indica uma variação entre grupos muito mais significativa (32,88%), concordando com as relações de parentesco obtidas nas análises filogenéticas (Tabela 7). Embora a variação dentro de grupos seja menor do que a estimada para a primeira hipótese de agrupamento, ela ainda apresenta valores mais altos. Isso indica, que apesar da proximidade filogenética entre populações inferidas pelos cladogramas, a variação genética entre cada uma das populações é alta.

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA), considerando-se dois grupos: localidades da Serra da Mantiqueira e da Serra do Mar. **GL**: graus de liberdade; **SQ**: soma de quadrados

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	Varição Total (%)	P
Entre grupos	1	675	0,183	0,50	0,000
Entre pops dentro de grupos	5	2,823	25,758	69,80	0,000
Dentro de populações	151	1,655	10,963	29,71	0,000
Total	157	5,154	36,905		
Φ_{ST} : 0,702					

Adicionalmente, para ambas as hipóteses de agrupamento, foram obtidos valores de Φ_{ST} altos (0,702 e 0,727, respectivamente), indicando forte estruturação das populações. Apesar da variação dentro de população ser moderada (29,71% e 27,23%, respectivamente), ambas apresentam maior variação entre populações de um mesmo grupo (69,80% e 39,89%, respectivamente).

Tabela 7 - Análise de variância molecular (AMOVA), considerando-se três grupos: localidades do Rio de Janeiro e a de Alto Caparaó, localidades de São Paulo e a localidade de Lima Duarte. **GL**: graus de liberdade; **SQ**: soma de quadrados

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	Varição Total (%)	P
Entre grupos	2	2,183	13,238	32,88	0,000
Entre pops dentro de grupos	4	1,315	16,060	39,89	0,000
Dentro de populações	151	1,655	10,963	27,23	0,000
Total	157	5,154	40,262		
Φ_{ST} : 0,727					

5 DISCUSSÃO

O uso de marcadores dominantes em análises filogenéticas é ainda restrito, possivelmente devido ao alto grau de homoplasia sugerido pela ocorrência de fragmentos co-migrantes (BUSSELL; WAYCOTT; CHAPPILL, 2005). Neste estudo adotou-se temperaturas de anelamento mais altas (em média 7°C) do que as comumente utilizadas em estudos similares com marcadores ISSR. Esta estratégia resulta em um número menor de bandas por amostra amplificada, demandando a utilização de um maior número de iniciadores, entretanto a identificação de bandas homólogas é extremamente mais acurada. Os resultados obtidos tanto para as análises filogenéticas, quanto para as de diversidade genética, demonstram que marcadores ISSR podem ser utilizados para responder questões evolutivas em complexos de espécies de forma consistente e com valores de confiabilidade altos. A facilidade de otimização, a rapidez na obtenção de resultados, somados à quantidade de locos polimórficos obtidos neste estudo comprovam a eficiência dos marcadores ISSR em estudos em evolução.

Os resultados das análises filogenéticas mostraram-se consistentes comparando-se ambos critérios utilizados. Claramente, as espécies tradicionalmente denominadas de *Cattleya coccinea* e *C. mantiqueirae* não podem ser consideradas como espécies distintas, levando-se em consideração o conceito filogenético de espécies. O critério de distinção de espécies proposto por Fowlie (1987) de acordo com a ocorrência geográfica é equivocado, uma vez que populações ocorrentes em Serras distintas são filogeneticamente mais próximas do que outras populações ocorrentes na mesma Serra. Em um primeiro momento, a distância geográfica menor em relação as outras populações poderia ser atribuída como o fator que explica a proximidade filogenética entre populações, como Petrópolis/RJ e Nova Friburgo/RJ, ambas na Serra do Mar, que aparecem como populações irmãs. Entretanto, as populações de Lima Duarte/MG e Petrópolis/RJ, por exemplo, apesar de estarem relativamente próximas também (aproximadamente 170 km), são filogeneticamente muito distantes.

Além de critérios geográficos, Fowlie (1987) também considerou caracteres morfológicos para a separação das espécies. Embora este estudo não tenha considerado caracteres morfológicos, observações em campo sugerem que as populações apresentam grande polimorfismo de caracteres vegetativos e florais, sobretudo forma de pseudobulbos e folhas e

tamanho e coloração de flores. O desenvolvimento de um estudo morfológico comparativo entre populações é fundamental para esclarecer padrões de variação no complexo *C. coccinea*.

A princípio, os resultados corroboram o reconhecimento de uma única espécie para o complexo *C. coccinea* – *C. mantiqueirae*. Entretanto, o monofiletismo de todo complexo também não foi corroborado pelos dados obtidos. A população de *C. mantiqueirae* (Lima Duarte/MG) mostrou-se como filogeneticamente mais próxima das espécies *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana* do que das outras populações do complexo *C. coccinea* – *C. mantiqueirae*. Este padrão filogenético pode ser explicado pela retenção de polimorfismos ancestrais causada por eventos de especiação recente, ou ainda pela ocorrência de eventos de hibridização entre linhagens distintas. Estudos complementares, considerando marcadores alternativos (sequências plastidiais e microssatélites) são necessários para melhor compreensão de processos históricos e demográficos no grupo.

As análises de genética de populações indicam que há baixa variabilidade entre indivíduos dentro das populações. Apesar dos valores totais de locos polimórficos obtidos a partir dos marcadores ISSR terem sido altos, os valores intrapopulacionais foram baixos a moderados. Em um estudo baseado também em marcadores ISSR para a espécie arbórea de Mata Atlântica, *Myrcia splendens* (Myrtaceae), Brandão (2008) obteve valores altos (entre 75,4% e 94,2%) de locos polimórficos, enquanto nesse estudo, os valores variaram de 20,34% a 33,56% (Tabela 5).

Conforme relatado na seção de Materiais e Métodos, a população de Alto Caparaó/MG foi subdividida em duas devido a condições ecológicas distintas. Os resultados obtidos indicam que há diferenças significativas na estrutura genética das duas subpopulações, apesar de geograficamente próximas (distância de aproximadamente 2 km). A localidade de Alto Caparaó/MG 1, apesar de possuir uma amostragem de apenas seis indivíduos, foi a que apresentou os maiores índice de variabilidade, tanto para o índice de Shannon, quanto para a diversidade genética de Nei, quando comparada com todas as outras localidades. Tal fato reforça o resultado das análises filogenéticas e sugere a possível ocorrência de eventos de hibridização que necessitam ser melhor explorados.

A baixa variabilidade genética intrapopulacional em populações naturais de orquídeas é recorrente na literatura. Em um estudo semelhante, também com marcadores ISSR, George; Sharma; Yadon, (2009) estudaram populações da espécie de orquídea terrestre ameaçada *Piperia yadonii*. Os autores obtiveram resultados similares, com índices de diversidade de Nei muito

baixos (entre 0,071 e 0,053). Sun; Wong, (2001) e Li; Xu; He (2002) também obtiveram resultados semelhantes em estudos com marcadores RAPD. Além disso, vários estudos realizados com isoenzimas em populações de orquídeas alógamas obtiveram também valores de diversidade genética baixos. Tanto o estudo de Little et al. (2005), com a orquídea terrestre *Platanthera lacera*, quanto de Alcântara; Semir; Solferini (2006), que estudaram a espécie epifítica *Oncidium hookerii*, sugerem que fluxo gênico restrito por causa da distância geográfica entre populações; tamanho pequeno de populações; efeito do fundador e gargalos genéticos, podem explicar a baixa variabilidade genética observada nessas espécies.

No entanto, há exceções para esse padrão. Ávila-Díaz; Oyama (2007) que estudaram populações de orquídeas epifíticas chamadas *Laelia speciosa* no México a partir de aloenzimas, obtiveram valores altos para o índice de diversidade de Nei (0,382). Segundo os autores, as espécies de orquídeas terrestres geralmente apresentam índices de diversidade genética menores que o de espécies epifíticas, pois as plantas epifíticas possuem diferentes estratégias de sobrevivência, como por exemplo, a ocorrência de indivíduos com reprodução alógama e autógama simultaneamente, ampla distribuição geográfica e plantas perenes com longos períodos de sobrevivência. Infelizmente, não há estudos disponíveis sobre estrutura genética de populações de orquídeas terrestres na Mata Atlântica que permitam a comparação com os resultados obtidos.

Os valores obtidos de diferenciação entre populações nas análises de variância molecular corroboram padrões filogenéticos encontrados. Para as duas hipóteses de agrupamento foram obtidos altos valores de diferenciação entre populações, assim como o coeficiente de diferenciação populacional. Esses valores sugerem uma forte estruturação populacional, ou seja, a taxa de fluxo gênico entre as populações é muito baixa, como também sugerido pela presença de loci exclusivos em cada população. Esses dados são semelhantes aos obtidos por Wallace (2004) que a partir de marcadores ISSR estudou a espécie de orquídea terrestre *P. aquilonis* e obteve valores de $\Phi_{ST} = 0,70$, enquanto que Forrest et al., (2004) estudou populações de *Spiranthes romanzoffiana* a partir de marcadores AFLP que apresentaram valores também altos ($\Phi_{ST} = 0,89$).

Segundo Hamrick; Loveless (1989) as diferenças na estrutura genética de plantas podem ser atribuídas, entre outros fatores, aos diferentes tipos de fluxo gênico, que incluem a dispersão de sementes e a polinização (por animais ou pelo vento). As espécies de plantas que são polinizadas pelo vento geralmente apresentam índices menores de diferenciação

interpopulacional comparadas as espécies polinizadas por animais. Na família Orchidaceae, a maioria das espécies são polinizadas por insetos, principalmente da ordem Hymenoptera (DRESSLER, 1993), sendo as espécies do complexo *C. coccinea* provavelmente polinizadas por beija-flores, conforme observado por Buzato; Sazima (2000) para espécie *C. mantiqueirae*. Outros fatores que influenciam a diferenciação genética entre populações de orquídeas é a deriva genética que leva a perda de alelos, associada a fragmentação e posterior isolamento de habitats, que por sua vez limitam a dispersão de pólen por insetos, conforme demonstrado por Li; Ge (2006) para uma população de *Changnienia amoena*.

Com relação às hipóteses de agrupamento testadas na análise de variância molecular, foram obtidos resultados condizentes com os obtidos por outras análises (Tabelas 6 e 7). A hipótese de que populações que ocorrem na Serra do Mar são divergentes das que ocorrem na Serra da Mantiqueira resultou em um valor muito baixo de variação entre grupos (0,50%), sendo que as maiores diferenças encontradas estão entre populações dentro de grupos (69,80%). Ou seja, esses dados reforçam os resultados das análises filogenéticas de que não há agrupamentos (espécies) de acordo com a região de ocorrência das populações.

Entretanto, as hipóteses de agrupamento de acordo com os clados obtidos nas análises filogenéticas apresentam valores de variabilidade muito mais elevados (variabilidade genética entre grupos = 32,88%; variabilidade entre populações dentro de grupos = 39,89%). O valor de variabilidade dentro de populações foi de 27,23%, que é semelhante à primeira hipótese de agrupamento, indicando os indivíduos de cada população são mais semelhantes entre si e que os maiores valores de diversidade estão fora e não dentro das populações. Portanto, pode-se inferir que os valores obtidos na segunda hipótese de agrupamento são os mais condizentes com todo conjunto de resultados obtidos até o momento.

A grande diversidade taxonômica da família Orchidaceae é muitas vezes atribuída à radiação adaptativa relativa à especialização dos agentes polinizadores, impulsionada pela seleção natural e alogamia. Entretanto Tremblay et al. (2005) sugerem que, em muitas situações, a deriva genética pode ser tão importante como a seleção natural na grande diversidade de espécies dessa família de plantas.

Os resultados obtidos pelas análises filogenéticas e populacionais para *C. coccinea* e *C. mantiqueirae* indicam alta estruturação de populações, sugerindo que a deriva genética pode ser um importante mecanismo na diferenciação genética entre populações e, até mesmo, espécies do

complexo *C. coccinea*. Os valores baixos de diversidade genética dentro de populações de *C. coccinea* e *C. mantiqueirae* sugerem a ocorrência de gargalos genéticos ocasionados por intensa fragmentação dos habitats (diferentemente do observado no estudo de ÁVILA-DIAS; OYAMA, 2007), pois observou-se um tamanho populacional reduzido em quase todas as localidades, a exceção foi a localidade de Lima Duarte, MG. Outro fator que contribui para a alta estruturação de populações é a ocorrência restrita dessas plantas em formações vegetacionais acima de 1000 msm.

5.1 Estratégias de conservação

De acordo como os resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar que não se pode reconhecer *Cattleya coccinea* e *C. mantiqueirae* como espécies distintas, além disso os indivíduos de cada população apresentam valores baixos de diversidade genética, apesar de haver diferenças entre as populações, ou seja a diversidade é maior entre do que dentro das mesmas. Esse fato é de fundamental importância para a elaboração de estratégias de conservação pois, neste caso, tanto para a conservação *ex situ* como *in situ* deve-se considerar como prioridade a conservação de todas as populações, pois cada uma delas apresenta alelos exclusivos.

A elaboração de métodos de conservação *ex situ*, e a formação de bancos de germoplasmas para essas espécies ameaçadas, são estratégias viáveis pois asseguram a conservação de espécies e possibilitam a ocorrência de programas de reintrodução de espécies nativas, como em projetos de recuperação de áreas degradadas. A quantidade de indivíduos de cada população não é um fator crucial em caso de coletas para amostragem de diversidade para a formação dos bancos, pois coletas contendo poucos indivíduos já seriam suficientes para uma amostragem considerável da diversidade genética.

No momento da coleta deve-se ter a atenção de não retirar todo o indivíduo, pois alguns pseudobulbos já garantem a sobrevivência de um exemplar (de 3 a 4 pseudobulbos). Isto evita o risco de perda de indivíduos desnecessariamente, em populações que na maioria das vezes já apresentam escassez de indivíduos. Outro aspecto importante a ser levantado, e que foi observado com os espécimes mantidos em cultivo utilizados neste trabalho, são as condições de cultivo, pois

tanto *Cattleya coccinea* quanto de *C. mantiqueirae* ocorrem em áreas que apresentam características que não são encontrados em qualquer região (altitude elevada, altos níveis de umidade do ar, temperaturas amenas). Portanto, bancos de germoplasmas que contêm esses exemplares devem apresentar características semelhantes.

Para a conservação *in situ*, apesar do fato de que quase todas as localidades amostradas já pertencerem a parques nacionais e estaduais ou reservas particulares, como no caso da população de Nova Friburgo/RJ (a exceção é a população de Petrópolis/RJ), torna-se necessário atentar-se que, as espécies aqui estudadas, apresentam alto valor ornamental, conseqüentemente a coleta indiscriminada nestas populações é um risco iminente. Mesmo estando em áreas de parques que visem a conservação, essas espécies ainda correm sério risco de serem dizimadas. Para minimizar impactos como esse são necessários programas de educação ambiental que tenham como objetivo alertar ao enorme prejuízo ambiental existente na coleta indiscriminada de espécies de orquídeas, não apenas as de valor ornamental.

6 CONCLUSÕES

Este estudo buscou avaliar se a variação em marcadores moleculares ISSR corroboram a hipótese de delimitação de espécies proposta por Fowlie baseada em caracteres morfológicos e distribuição geográfica.

A hipótese levantada de que as populações de orquídeas coletadas em localidades da Serra do Mar são pertencentes a espécie *C. coccinea* e que as coletadas em localidades da Serra da Mantiqueira pertencem as *C. mantiqueirae* não apresentou suporte em nenhuma análise realizada neste estudo. As populações de *C. coccinea* e *C. mantiqueirae* apresentam alto grau de isolamento, mas ainda compartilham parte do alelos observados em outras populações. A deriva genética e a ocorrência de eventos de hibridização podem ser importantes processos na diversificação de populações. Os resultados obtidos deixam claro a necessidade em conservar populações distintas, fora e dentro de unidades de conservação.

Estudos complementares, considerando aspectos morfológicos, da biologia reprodutiva, citogenética, e filogeográficos, são necessários para compreensão de processos evolutivos ocorridos neste grupo.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A.N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul, primeira aproximação. **Geomorfologia**, São Paulo, v. 52, p. 121, 1977.
- ALCANTARA, S.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the atlantic rainforest of south-eastern Brazil. **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 1207-1213, 2006.
- ALLENDORF, F.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Malden: Blackwell Publishing, 2007. 664 p.
- ANAND, K.K.; SRIVASTAVA, R.K.; CHAUDHARY, L.B.; SINGH, A.K. Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabacea) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. **Taiwania**, Taipei, v. 55, p. 197-207, 2010.
- ARCHAK, S.; GAIKWAD, A.B.; GAUTAN, D.; RAO, E.V., SWAMY, K.R.; KARIHALOO, J.L. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. **Genome**, Ottawa, v. 46, n. 3, p. 362-369, 2003.
- ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 94, p. 184-193, 2007.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, JR.R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REED, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BARKER, M.S.; HAUKE, W.D. An evaluation of *Sceptridium dissectum* (Ophioglossaceae) with ISSR markers: implications for *Sceptridium* systematics. **American Fern Journal**, Washington, v. 93, p. 1-19, 2003.
- BENTHAM, G. Notes on orchideae. **Journal Linnean Society Botany**, London, v. 18, p. 281-360, 1881.
- BORBA, E.L.; FELIX, J.M.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **American Journal of Botany**, New York, v. 88, p. 419-428, 2001a.
- BRANDÃO, M.M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor fragmento no sul de Minas Gerais**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Diversidade brasileira**, 2004. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/biodiv/biodiv.html>>. Acesso em: 5 ago. 2009.

BROWN, P.M.; DUECK, L.A.; CAMERON, K.M. *Spiranthes stellata* (Orchidaceae), a new species of ladies'-tresses from the western United States. **North American Native Orchid Journal**, Kansas City, v. 14, p. 3-21, 2008.

BUSO, G.S.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of south American wild rice populations (*Oryzoglumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 7, p. 107-117, 1998.

BUSSELL, J.D.; WAYCOTT, M.; CHAPPILL, J.A. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Jena, v. 7, p. 3-26, 2005.

BUZATO, S.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic forest sites. **Biotropica**, Washington, v. 32, p. 824-841, 2000.

CAMERON, K.M. Leave it to the leaves: a molecular phylogenetic study of Malaxideae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 92, p. 1025-1032, 2005a.

_____. Recent advances in the systematics biology of *Vanilla* and related orchids (Vanilloideae, Orchidaceae). In: VANILLA FIRST INTERNATIONAL CONGRESS, 2005, Carol Stream, **Anais...** Carol Stream: Allured Publishing, 2005b. p.89-93.

_____. On the value of taxonomy, phylogeny, and systematics to orchid conservation: Implications for China's Yachang orchid reserve. **Botanical Review**, New York, v. 76, p. 165-173, 2010.

CAMERON, K.M.; CHASE, M.W.; WHITTEN, W.M.; KORES, P.J.; JARRELL, D.C.; ALBERT, V.A.; YUKAWA, T.; HILLS, H.G.; GOLDMAN, D.H. Evidence from *rbcL* nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, New York, v. 86, p. 208-224, 1999.

CARVALHO, M.R.; AMORIN, D.S.; BOCKMANN, F.A.; DE VIVO, M.; FIGUEIREDO, J.L.; NELSON, G.; VARI, R.P. Revisiting the taxonomic impediment. **Science**, Washington, v. 307, p. 353-353, 2005.

CAVALLARI, M. M.; FORZZA, R.C. ; VEASEY, E.A. ; ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X.O. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. **Biodiversity and Conservation**, Madri, v. 15, p. 4357-4373, 2006.

CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 19, p. 233-257, 1967.

CHASE, M. W. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. **Curtis's Botanical Magazine**, London, v. 22, p. 2-7, 2005.

CHASE, M.W.; CAMERON, K.M.; BARRETT, R.L.; FREUDENSTEIN, J.V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K.W.; KELL, S.P.; BARRETT, R.L.; CRIBB, P.J. (Ed.). **Orchid conservation**. Kota Kinabalu: Natural History Publications, 2003. p. 69-89.

CHASE, M.W.; WILLIAMS, N.H.; DE FARIA, A.D.; NEUBIG, K.M.; AMARAL, M.C.E.; WHITTEN, W.M. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsi*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, p. 387-402, 2009.

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

COLLINS, D.; MILL, R.R.; MÖLLER, M. Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis*, and *T. cuspidata* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data. **American Journal of Botany**, New York, v. 90, p. 175-182, 2003.

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

COZZOLINO, S.; CAFASSO, D.; PELLEGRINO, G.; MUSACCHIO, A.; WIDMER, A. Fine-scale phylogeographical analysis of mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 12, p. 2783-2792, 2003.

CUMMINGS, M.P.; NEEL, M.C.; SKAW, K.L. A genealogical approach to quantifying lineage divergence. **Evolution**, Lancaster, v. 62, p. 2411-2422, 2008.

CRACRAFT, J. Species concepts in theoretical and applied biology: a systematic debate with consequences. In: WHEELER, Q.; MEIER, R. (Ed.). **Species Concepts: a debate**. New York: Columbia University Press, 2000. p. 28-59.

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

DEPRÉS, L.; GIELLY, L.; REDOUTET, B.; TABERLET, P. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, New York, v. 27, p. 185-196, 2003.

DEVEY, D.S.; BATEMAN, R.M.; FAY, M.F.; HAWKINS, J.A. Friends or relatives? phylogenetics and species delimitation in the controversial european orchid genus *Ophrys*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 101, p. 385-402, 2008.

DIXON, K.W.; KELL, S.P.; BARRETT, R.L.; CRIBB, P.J. (Ed.). **Orchid conservation**. Kota Kinabalu: Natural History Publications, 2003. p. 159-182.

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

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press, 1993. 316 p.

DOGAN, B.; DURAN, A.; HAKKI, E.E. Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. **Annales botanici Fennici**, Helsinki, v. 44, p. 353-358, 2007.

ELIAS, I.; LANGERGREN, J. Fast neighbor-joining. **Theoretical Computer Science**, Chicago, v. 410, p. 1993-2000, 2009.

EHRlich, P.R. The loss of diversity – causes and consequences. In: WILSON, E.O. (Ed.). **Biodiversity**. Washington: National Academy Press, 1988. p. 21-27.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from matrix distances among DNA haplotypes: application to human mitochondria DNA restriction data. **Genetics**, Pittsburgh, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, L.G.; SCHNEIDER, S. Arlequin: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Heidelberg, v. 1, p. 47-50, 2005.

FANG, D.Q.; ROOSE, M.L.; KRUEGER, R.R.; FEDERICI, C.T. Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 211-219, 1997.

FAY, M.F.; CHASE, M.W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**, Oxford., v. 104, p. 359-364, 2009.

FAY, M.F.; COWAN, R.S.; LEITCH, I.J. The effects of nuclear DNA content (C2 value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, p.237-246, 2005.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220 p.

FITCH, W.M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology**, New York, v. 20, p. 406-416, 1971.

FITCH, W. M.; MARGOLISH, E. Construction of phylogenetic trees. **Science**, Washington, v. 155, p. 279-284, 1967.

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

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

_____. A contribution to a monographic revision of the genus *Sophranitis* Lindl. **Orchid Digest**, Calabasas, v. 51, n. 1, p. 15-32, 1987.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: University Press, 2004. 220 p.

FREUDENSTEIN, J.V.; VAN DEN BERG, C.; GOLDMAN, D.H.; KORES, P.J.; MOLVRAJ, M.; CHASE, M.W. An expanded plastid DNA phylogenetic analysis of Orchidaceae and analysis of jackknife clade support strategy. **American Journal of Botany**, New York, v. 91, p. 149-157, 2004.

FUTUYMA, D.J. **Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 603 p.

GARNER, T.W.J. Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential .**Genome**, Ottawa, v. 45, p. 212-215, 2002.

GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V.L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**, New York, v. 96, p. 2022-2030, 2009.

GOLDMAN, N.; YANG, Z. Introduction. statistical and computational challenges in molecular phylogenetics and evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 363, p. 3889-3892, 2008.

GOLDMAN, D.H.; VAN DEN BERG, C.; GRIFFITH M.P. Morphometric circumscription of species and infraspecific taxa in *Calopogon* R. Br. (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 247, p. 37-60, 2004.

GOLDWIN, I.D.; AITKEN, A.B.; SMITH, L.W. Application of inter simple sequence repeats (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, Malden, v. 18, p. 1524-1528, 1997.

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.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: BOCK, J.H.; LINHART, Y.B. (Ed.). **The Evolutionary Ecology of Plants**. Boulder: Westview Press, 1989. p.129-146.

HAO, G.; LEE, D.H.; LEE, J.S.; LEE, N.S. A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *Sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 43, p. 63–68, 2002.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 304 p.

HENNIG, W. **Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik**. Berlin: Deutscher Zentralverlag, 1950. 370 p.

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Diretoria de Geociências, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.html>>. Acesso em: 18 mar. 2010.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE – IUCN. **Guidelines for the prevention of biodiversity loss due to biological invasion**. 1999. Disponível em: <http://www.iucn.org/knowledge/publications_doc/publications>. Acesso em: 28 fev. 2009.

KAMADA, T.; YAMASHIRO, T.; MAKI, M. Intraspecific morphological and genetic differentiation in *Scrophularia grayana* (Scrophulariaceae). **Journal of Plant Research**, Tokio, v. 120, p. 437-443, 2007.

KANTETY, R.V.; ZENG, X.P.; BENNETZEN, J.L.; ZEHR, B.E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 1, p. 365-373, 1995.

KELLER, B.E.M. Genetic variation among and within populations of *Phragmites australis* in the Charles River watershed. **Aquatic Botany**, Nijmegen, v. 66, p. 195-208, 2000.

KLUGE, A.G.; J.S. FARRIS. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. **Systematic Zoology**, Washington, v. 18, p. 1-32, 1969.

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

KOEHLER, S.; CABRAL, J.S.; WHITTEN, W.M.; WILLIAMS, N.H.; SINGER, R.B.; NEUBIG, K.M.; GUERRA, M.; SOUZA, A.P.; AMARAL, M.C.E. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. **Annals of Botany**, Oxford, v. 102, p. 491-507, 2008.

- KOOPMAN, W. J. M. Phylogenetic signal in AFLP data sets. **Systematic Biology**, Oxford, v. 54, p. 197–217, 2005.
- KRINGS, A.; XIANG, Q.Y. The *Gonolobus* complex (Apocynaceae -Asclepiadoideae) in the southeastern United States. **Sida**, Texas, v. 21, p. 103-116, 2004.
- LI, Q; XU, Z; HE, T. *Ex situ* genetic conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China. **Biological Conservation**, London, v. 106, p. 151-156, 2002.
- LIGHT, M.H.S.; KOOPOWITZ, H.; MARCHANT, T.A. The impact of climatic, edaphic and physiographic factors on the population behaviour of selected temperate and tropical orchids. In:
- LINDLEY, J. **Genera and species of orchidaceous plants**. London: Ridgways, 1840. 553p.
- LITTLE, K. J.; DIERINGER, G.; ROMANO, M. Pollination ecology, genetic diversity and selection on the nectar spur length in *Platanthera lacera* (Orchidaceae). **Plant Species Biology**, Montreal, v. 20, p. 183-190, 2005.
- LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1 p. 205-208, 2001.
- LOPES, M.S.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.
- LUCK, G.W.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R. Population diversity and ecosystem services. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 18, p. 331-336, 2003.
- MAYDEN, R. L. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: CLARIDGE, M.F.; DAWAH, H.A.; WILSON, M.R. (Ed.). **Species: the Units of Biodiversity**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 381-424.
- MEYER, G.; CAMERON, K. A preliminary phylogenetic study of *Dracula* (Pleurothallidinae, Epidenderoideae, Orchidaceae) based on plastid *matK* sequence data. In: THE SECOND CONFERENCE ON ANDEAN ORCHIDS. 2009, Loja. **Proceedings...** Loja: Universidad Técnica Particular de Loja, 2009. p. 100-114.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain restriction. **Methods in Enzimology**, Pasadena, v. 55, p. 335-350, 1987.
- MURREN, C. J. Spatial and demographic population genetic structure in *Catasetum viridiflavum* across a human-disturbed habitat. **Journal of Evolutionary Biology**, Cornwall, v. 16, p. 333-342, 2003.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 597-602, 1997.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

OLIVEIRA, A. C.; RICHTER, T.; BENNETZEN, J. L. Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 579-587, 1996.

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

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

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

PANSARIN, E.R.; AMARAL, M.C.E. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? **Plant Biology**, Freiburg, v.10, p. 211-219, 2008.

PARSONS, B.J.; NEWBURY, H.J.; JACKSON, M.T.; FORD-LLOYD, B.V. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 3, p. 115-125, 1997.

PILLON, Y.; CHASE, M.W. Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. **Conservation Biology**, Boston, v. 21, p. 263-265, 2007.

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**, Vancouver, v. 19, p. 3981-3994, 2010.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (Ed.). **Genera Orchidacearum**: General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford: Oxford University Press, 1999. v. 1. 197 p.

_____. **Genera Orchidacearum**: Orchidoideae (Part one). Oxford: Oxford University Press, 2001. v. 2. 416 p.

_____. **Genera Orchidacearum**: Orchidoideae (Part two), Vanilloideae. Oxford: Oxford University Press, 2003. v. 3. 358p.

_____. **Genera Orchidacearum: Epidendroideae (Part one)**. Oxford: Oxford University Press, 2005. v. 4. 672 p.

_____. **Genera Orchidacearum: Epidendroideae (Part two)**. Oxford: Oxford University Press, 2009. v. 5. 608 p.

RAMSAY, M.M.; DIXON, K.W. Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. In: DIXON, K.W.; KELL, S.P.; BARRETT, R.L.; CRIBB, P.J. (Ed.). **Orchid conservation**. Kota Kinabalu: Natural History Publications, 2003. p. 259-288.

ROBERTS, D.L.; DIXON, K.W. Orchids. **Current Biology**, London, v. 18, n. 8, p. 325-329, 2008.

ROBINSON, W.A.; LISTON, A.; DOESCHER, P.S.; SVEJCAR, T. Using ISSR markers to quantify clonal vs. sexual reproduction in *Festuca idahoensis* (Poaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 54, p. 84-89, 1997.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, London, v. 4, p. 406-425, 1987.

SCHMIDT, K.; JENSEN, K.. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. **American Journal of Botany**, New York, v. 87, p. 678-689, 2000.

SEATON, P. T.; HU, H.; PERNER, H.; PRITCHARD H. W.. Ex situ conservation of orchids in a warming world. **Botanical Review**, New York, v. 76, p. 193-203, 2010.

SHARMA, I. K.; JONES, D. L.; FRENCH, C. J. Unusually high genetic variability revealed through allozymic polymorphism of an endemic and endangered Australian orchid, *Pterostylis aff. picta* (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Londres, v. 31, p. 513-526, 2003.

SLOTTA, T.A.B.; PORTER, D.M. Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 151, p. 345-354, 2006.

SMITH, S.D.; COWAN, R.S.; GREGG, K.B.; CHASE, M.W.; MAXTED, N.; FAY, M.F. Genetic discontinuities among populations of *Cleisthes* (Orchidaceae, Vanilloideae) in North America. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 145, p. 87-95, 2004.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. F., ENDRESS, P. K., Y CHASE, M. W. **Phylogeny and evolution of angiosperms**. Sunderland: Sinauer Associates. 2005. 100p.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluation systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, Kansas City, v. 38, p. 1409-1438, 1958.

SOUZA, G.A.; CARVALHO, M.R.; MARTINS, E.R.; GUEDES, R.N.; OLIVEIRA, L.O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

SOUZA, V.Q.; PEREIRA, A.S.; KOPP, M.M.; COIMBRA, J.M.; CARVALHO, F.F.; LUZ, V.K.; OLIVEIRA, A.C. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 569-575, 2005.

SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P. M.; BATEMAN, R. M.; DICKSON, J. H.; LIGHT, M. H. S.; MACCONAILL, M.; TEBBITT, M. C. Partitioning and diversity of nuclear and organelle markers in native and introduced populations of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 88, p. 1409-1418, 2001.

SUN, M.; WONG, K.C. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **American Journal of Botany**, New York, v.88, p.2180-2188, 2001.

SWARTS, N.D.; DIXON, K.W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, p. 543-556, 2009.

SWOFFORD, D.L. PAUP*: **Phylogenetic analysis using parsimony** (* and other methods), Version 4.0. 2000. Disponível em: <http://www.paup.csit.fsu.edu/Cmd_ref_v2.pdf>. Acesso em: 6 abr. 2009.

TANSLEY, S.A.; BROWN, C.R. RAPD variation in the rare and endangered (Proteaceae) implications for their conservation. **Biological Conservation**, London, v. 95, p. 39-48, 2000.

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

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p.

TRAPNELL, D. W.; HAMRICK, J. L. Partitioning nuclear and chloroplast variation at multiple spatial scales in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 13, p. 2655-2666, 2004.

_____. Mating patterns and gene flow in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.14, p.75-84, 2005.

TREMBLAY, R. L.; ACKERMAN, J. D. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 72, p. 47-62, 2001.

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.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S.H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 40-45, 1996.

VAN DEN BERG, C. New combinations in the genus *Cattleya* (Orchidaceae). **Neodiversity**, Feira de Santana, v. 3, p. 3-12, 2008.

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

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

_____. A chronological view of Laeliinae taxonomical history. **Orchid Digest**, Calabasas, v. 68, p. 226-254, 2004.

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

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.E.; DRESSLER, R.L.; WHITTEN, W.M.; SOTO ARENAS, M.A.; CULHAM, A.; CHASE, M.W. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 15, p. 96-114. 2000.

VEREecken, N.J.; DAFNI, A.; COZZOLINO, S. Pollination syndromes in Mediterranean orchids—implications for speciation, taxonomy and conservation. **Botanical Review**, New York, v. 76, p. 220-240, 2010.

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

WALLACE, L.E. Molecular evidence for allopolyploid speciation and recurrent origins in *Platanthera huronensis* (Orchidaceae). **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 164, p. 907–916, 2003.

_____. A comparison of genetic variation and structure in the allopolyploid *Platanthera huronensis* and its diploid progenitors, *Platanthera aquilonis* and *Platanthera dilatata* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 82, p. 244-252, 2004.

WHITTEN, W.M.; WILLIAMS, N.H.; CHASE, M.W. Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. **American Journal of Botany**, New York, v. 87, n. 12, p. 1842-1856. 2000.

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.

WILLIAMS, N.H.; CHASE, M.W.; FULCHER, T.; WHITTEN, W.M. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA regions: expanded circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum* and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). **Lindleyana**, Palm Beach, v. 16, n. 2, p. 113-139. 2001.

WILSON, E.D. **Diversidade da vida**. São Paulo: Companhia das Letras, 1994. 447 p.

WITHNER, C.L. **The Cattleyas and their relatives: Schomburgkia, Sophronitis, and other south American genera**. Portland: Timber Press, 1990. 154 p.

WOLFE, A.D. **ISSR protocols**. 2000. Disponível em:
<<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/protocols.ISSR.html>>. Acesso em: 18 mai. 2009.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular Systematics of Plants: DNA Sequencing**. New York: Kluwer, 1998. p.43-86.

WOLFE, A.D.; RANDLE, C.P. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. **Systematic Botany**, Oxford, v. 26, p. 120-130, 2001

WOLFE A.D.; XIANG Q.Y.;KEPHART, S.R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 7, p. 1107-1125, 1998.

WOLFF, K.; ZIETKIEWICZ, E.; HOFSTRA, H. Identification of *Chrysanthemum* cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, p. 439-447, 1995.

WOOD, T.E.; NAKAZATO, T. Investigating species boundaries in the Giliopsis group of *Ipomopsis* (Polemoniaceae): strong discordance among molecular and morphological markers. **American Journal of Botany**, New York, v. 96, p. 853-861, 2009.

WOODS, K.; HILU, K.W.; WIERSEMA, J.H.; BORSCH, T. Pattern of variation and systematics of *Nymphaea odorata*: evidence from morphology and inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Systematic Botany**, Oxford, v. 30, p. 471-480, 2005.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, Lancaster, v. 19, p. 395-420, 1965.

XIAO, L.Q.; GE, X.J.; GONG, X.; HAO, G.; ZHENG, S.X. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae), **Annals of Botany**, Oxford, v. 94, p.133-138, 2004.

YANG, W.P.; OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.; SCHERTZ, K.; BENNETZEN, J.L. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in chinese sorghums. **Crop Science**, Madison, v. 36 p. 1669-1676, 1996.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J.; YE, Z.H.; MAO, J.X. **POPGENE**, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, 1997. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2009.

YOUNG, A.G.; BOYLE, T.J. Forest fragmentation. In: YOUNG. A.; BOSHIER, D.; BOYLE. T (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Wallingford: Cabi Publishing, 2000. p. 123-134.

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.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.